



# Susceptibilité génétique des variants EP300 et PCAF au carcinome hépatocellulaire et rôle de septine 9, PIAS1 et SUMO1 dans la réplication du virus de l'hépatite C

Abdellah Akil

## ► To cite this version:

Abdellah Akil. Susceptibilité génétique des variants EP300 et PCAF au carcinome hépatocellulaire et rôle de septine 9, PIAS1 et SUMO1 dans la réplication du virus de l'hépatite C. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Sud - Paris XI; Université Mohammed V (Rabat), 2012. Français. NNT : 2012PA11T079 . tel-01083259

**HAL Id: tel-01083259**

**<https://theses.hal.science/tel-01083259>**

Submitted on 17 Nov 2014

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

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



**THÈSE DE DOCTORAT EN COTUTELLE ENTRE  
L'UNIVERSITÉ PARIS SUD-XI**

**Faculté de médecine**

**ET DE L'UNIVERSITÉ MOHAMMED V-AGDAL**

**Faculté des sciences-Rabat**

**Présentée à**

**L'UNIVERSITÉ Paris-Sud XI**

**École doctorale de cancérologie**

**Biologie-Médecine-Santé**

**Par Mr Abdellah AKIL**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR**

Discipline : Cancérologie, Virologie, Biologie Cellulaire et Moléculaire

**Sujet de thèse :**

**Susceptibilité génétique des variants EP300 et PCAF au carcinome hépatocellulaire et rôle de septine 9, PIAS1 et SUMO1 dans la réplication du virus de l'hépatite C**

**Soutenue le 16 /11 /2012**

**Devant le jury composé de :**

Pr.Didier Samuel, directeur de l'U785-inserm

Pr.Saaïd Amzazi, doyen de la faculté des Sciences Rabat

Pr.Abdelaziz Benjouad, directeur du CNRST-Maroc

Dr.Ama Gassama-Diane, chargé de recherche-Inserm U785

Dr.Pascal Pineau, Chargé de recherche Institut Pasteur-Paris

Dr.Soummaya Benjelloun, directeur de recherche -Institut Pasteur-Maroc

Dr.Jean Dubuisson, directeur de recherche Institut Pasteur-Lille

Dr. Youssef Bakri, Professeur Université Mohammed V

Président de jury

Examinateur

Directeur de thèse

Directeur de thèse

Examinateur

Examinateur

Rapporteur

Rapporteur

# Préface

## **PREFACE**

*A mes parents,*



## **PREFACE**

*Au cours de ces cinq dernières années passées à préparer ma thèse en cotutelle entre l'Université Mohammed V Agdal (Institut Pasteur du Maroc) et l'Université Paris Sud XI (Inserm U785), j'ai eu la possibilité de vivre une expérience extrêmement enrichissante au niveau personnel et professionnel. Ceci je le dois notamment aux nombreuses personnes qui m'ont entouré, encouragé et soutenu tout au long de cette épreuve et pour lesquelles je tiens à exprimer toute ma gratitude.*

*À Mr Abdelaziz Benjouad, Mme Ama Gassama et Mme Soumaya Benjelloun, mes deux directeurs et co-directeur de thèse qui m'ont permis de prendre part à cette collaboration et qui m'ont guidé tout au long de cette aventure. Merci de votre confiance, patience, soutien, pour tous ces échanges enrichissants et pour avoir partagé votre passion avec moi.*

*Aux membres de mon jury de thèse :*

*Merci au professeur Saaïd Amzazi actuel doyen de la faculté des sciences-Rabat Agdal de m'avoir donné la chance de faire ce travail en cotutelle entre l'université Mohammed V-Agdal et l'université Paris Sud XI. Merci au Professeur Didier Samuel, directeur de l'Unité Inserm 785, pour avoir évalué ce travail en tant que président du jury, merci au professeur Youssef Bakri directeur du laboratoire génie Immunologique et Biochimique à la faculté des sciences Rabat et au Docteur Jean Dubuisson directeur de recherche à l'institut Pasteur de Lille et expert de renommée internationale dans le domaine des infections virales, de m'avoir fait l'honneur de jurer mes travaux de recherche et en tant que rapporteurs.*

*Merci au docteur Pascal Pineau, chargé de recherche à l'unité organisation génomique et oncogénèse de l'Institut Pasteur de Paris, Qui m'a guidée humainement et professionnellement lors de mon premier stage dont je garde un si bon souvenir. Qu'il veuille bien agréer l'hommage de ma vive reconnaissance et de mon profond respect.*

*Mes remerciements vont également aux Professeurs Christian Bréchet, ancien directeur de l'Unité Inserm 785 et Christian Auclair directeur de l'école doctorale de Cancérologie-Université Paris SudXI, qui ont toujours fait montre d'une grande disponibilité en dépit de leurs nombreuses responsabilités.*

*J'adresse mes plus vifs remerciements aux Professeur Jamila Faivre et Dr. Mylène Sebah, je leur souhaite plein succès à Villejuif.*

## PREFACE

*Merci au service Internationale de l'Université PARIS SUD, le Réseau International des Instituts Pasteur et à l'association CHB dont le soutien financier a été indispensable pour mener ces travaux.*

*Je remercie également mes collègues au laboratoire: Michael marin, sar sokhavuth, Juan Peng, Dr.nicolas moniaux, Dr. Marion Bourgeade, Dr. Marion Darnaud, Dr. guillaume fallot, Dr.Claire lacoste, Elvire Beleoken Nassima Benzoubir et Dr. Ezzikourri Sayeh pour m'avoir aidé dans l'apprentissage des techniques usuelles de biologie moléculaire et cellulaire, leurs expertises dans les aspects cellulaires et moléculaires de notre travail, appréciable.*

*Je ne saurais oublier tous les autres membres de l'équipe pour leur soutien et leur efficacité dans bien d'autres domaines: Vincent Quilin, Marina Bats et Maurice Fontaine, je veux que vous sachiez que j'ai du respect et de l'amour pour vous.*

*Merci à mes chers amis Mohammed Zahid et Rachad el Namer pour leur grand soutien et leur générosité.*

*Un grand merci à mon cher alex, merci pour ta disponibilité, ta gentillesse et surtout ta bonne humeur, merci bcp cher frère. ....SR.*

*Je ne pourrais terminer sans mentionner Madame Muriel NICOLETTI, qu'elle puisse trouver dans ces lignes l'expression de mon immense gratitude.*

*Je veux très spécialement exprimer ma gratitude à tous les membres de ma famille pour leur amour, leur soutien dans la vie et dans ce travail en particulier. Mon succès est aussi le leur.*

*Enfin à toutes les personnes, qui de près ou de loin, ont contribuées à ce travail ou été présentes lors de la thèse, je vous remercie du fond du cœur.*

# TABLE DE MATIERES

## **TABLE DE MATIERES**

|                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------|----|
| Introduction.....                                           | 1  |
| I. LE CARCINOME HEPATOCELLULAIRE.....                       | 3  |
| A. Données épidémiologiques.....                            | 3  |
| B. Données physiopathologique.....                          | 3  |
| C. Facteurs étiologiques du carcinome hépatocellulaire..... | 3  |
| 1) Facteur non viraux.....                                  | 4  |
| a. L'alcool.....                                            | 4  |
| b. L'hémochromatose.....                                    | 4  |
| c. L'aflatoxine B1.....                                     | 5  |
| d. Le Tabac.....                                            | 5  |
| e. Autres facteurs influençant la survenue du CHC.....      | 5  |
| i. Surpoids, diabète et stéato-hépatite non alcoolique..... | 5  |
| ii. Facteurs démographiques.....                            | 5  |
| 2) Les Altérations génétiques et le cancer.....             | 6  |
| 3) Les polymorphismes génétiques et le cancer.....          | 7  |
| a. Les études d'association.....                            | 8  |
| b. Les études gènes candidats.....                          | 9  |
| i. P300, structure et fonctions.....                        | 10 |
| ii. PCAF, structure et fonctions.....                       | 11 |
| 4) Facteurs viraux.....                                     | 12 |
| a. Association VHB et CHC.....                              | 12 |
| b. Association VHC et HCC.....                              | 12 |
| II. le virus de l'hépatite C.....                           | 13 |
| A. données épidémiologiques et cliniques.....               | 13 |

## **TABLE DE MATIERES**

|                                                                                    |    |
|------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1) Découverte de l'agent responsable de la maladie.....                            | 13 |
| 2) Epidémiologie de l'hépatite C.....                                              | 15 |
| a. Prévalence de l'infection.....                                                  | 15 |
| b. Modes de contamination.....                                                     | 16 |
| i. Transmission parentérale.....                                                   | 16 |
| ii. Transmission sexuelle.....                                                     | 17 |
| iii. Transmission intra-familiale.....                                             | 17 |
| iv. Transmission mère-enfant.....                                                  | 17 |
| v. Infections sporadiques.....                                                     | 18 |
| c. Groupes à risque.....                                                           | 18 |
| B. Données moléculaires, modèles d'études.....                                     | 18 |
| 1) Classification.....                                                             | 18 |
| 2) Organisation structurale et génomique.....                                      | 19 |
| 3) Expression et fonction des protéines virales.....                               | 22 |
| a. La protéine de capside ou protéine C.....                                       | 22 |
| b. La protéine F (frameshift) ou ARF (alternative reading frame)<br>ou core+1..... | 22 |
| c. les protéines d'enveloppe E1 et E2.....                                         | 23 |
| d. la protéine P7.....                                                             | 23 |
| e. la NS2-3 protéase.....                                                          | 23 |
| f. le complexe NS3-4.....                                                          | 23 |
| g. la protéine NS4B.....                                                           | 24 |
| h. la protéine NS5A.....                                                           | 24 |
| j. la protéine NS5B.....                                                           | 24 |
| 4) Variabilité génétique du VHC.....                                               | 25 |
| a. Émergence et diversification des géotypes du VHC.....                           | 25 |

## **TABLE DE MATIERES**

|                                                                                                           |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| b. Distribution en quasi-espèces des génomes du VHC.....                                                  | 28 |
| c. Implication cliniques.....                                                                             | 28 |
| III. Les principaux systèmes d'étude du virus de l'hépatite C.....                                        | 29 |
| A. Les modèles animaux.....                                                                               | 29 |
| 1) Le chimpanzé.....                                                                                      | 29 |
| 2) Souris chimériques.....                                                                                | 29 |
| 3) Souris humanisées.....                                                                                 | 30 |
| B. Les modèles cellulaires.....                                                                           | 30 |
| 1) Les réplicons subgénomiques et génomique.....                                                          | 31 |
| 2) Les pseudoparticules VHC.....                                                                          | 32 |
| 3) Les particules du VHC produites en cultures cellulaires.....                                           |    |
| (JFH1 culture cellulaire).....                                                                            | 34 |
| IV. Cycle de vie du VHC.....                                                                              | 35 |
| A. Les voies d'entrée, internalisation de la particule virale, fusion avec la<br>membrane endosomale..... | 37 |
| B. La Traduction de la polyprotéine virale.....                                                           | 38 |
| C. La Maturation de la polyprotéine.....                                                                  | 39 |
| D. La Réplication virale.....                                                                             | 39 |
| E. Assemblage et sécrétion des particules virales.....                                                    | 41 |
| 1. VHC et gouttelettes lipidiques.....                                                                    | 43 |
| V. Physiopathologie.....                                                                                  | 45 |
| A. Evolution de la maladie et symptômes cliniques.....                                                    | 45 |
| B. Hépatite C aigüe.....                                                                                  | 45 |
| C. Hépatite C chronique.....                                                                              | 46 |

## **TABLE DE MATIERES**

|                                                                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| VI. Carcinogénèse liée du VHC : rôle biologique des protéines virales.....                                      | 47 |
| A. Rôle de la capside.....                                                                                      | 47 |
| 1) Modulation de l'expression des gènes.....                                                                    | 47 |
| 2) Interactions avec le système immunitaire.....                                                                | 48 |
| 3) Rôle dans le métabolisme lipidique.....                                                                      | 48 |
| 4) Effets sur l'apoptose.....                                                                                   | 49 |
| B. Rôles des autres protéines virales.....                                                                      | 49 |
| VII. Tropisme hépatique et cibles extra-hépatiques.....                                                         | 49 |
| VIII. Les stratégies thérapeutiques.....                                                                        | 50 |
| IX. Structure, Fonctions cellulaires des Septines.....                                                          | 52 |
| X. Septines et Physiopathologie.....                                                                            | 53 |
| A. Septines et cancers.....                                                                                     | 53 |
| B. Septines et maladies infectieuses.....                                                                       | 53 |
| C. Septine 9.....                                                                                               | 54 |
| D. Septines et SUMOylation.....                                                                                 | 55 |
| XI. La famille PIAS.....                                                                                        | 57 |
| Objectifs.....                                                                                                  | 58 |
| XII. Résultats et discussions.....                                                                              | 60 |
| A. Partie I : Association des SNPs EP300 Ile997Val et PCAF Asn386Ser avec Le<br>carcinome hépatocellulaire..... | 60 |
| 1. Introduction 1.....                                                                                          | 61 |
| a. Caractéristiques des populations étudiées.....                                                               | 61 |
| b. EP300 : Distribution des génotypes .....                                                                     | 61 |
| c. PCAF : Distribution des génotypes.....                                                                       | 62 |
| 2. Discussion 1.....                                                                                            | 83 |

## **TABLE DE MATIERES**

|                                                                                                  |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| B. Partie II : Rôle de Septine 9, PIAS1, SUMO1 dans la réplication du virus de l'hépatite C..... | 85  |
| 1. Introduction 2.....                                                                           | 86  |
| a. Septine9, PIAS1, SUMO1 : nouveaux facteurs cellulaires pour la<br>réplication du VHC.....     | 86  |
| 2. Discussion 2.....                                                                             | 126 |
| XIII. Conclusions perspectives.....                                                              | 128 |
| XIV. Références bibliographiques.....                                                            | 132 |
| XV. Annexes.....                                                                                 |     |



# LISTE DES FIGURES

## **LISTE DES FIGURES**

- Figure 1:** Organisation structurale de PCAF et p300
- Figure 2:** Prévalence de l'infection par le VHC estimée par l'OMS en 2003.
- Figure 3:** Arbre phylogénique de la famille des Flaviviridae
- Figure 4:** Structure schématique de la particule virale C
- Figure 5:** Organisation génomique du VHC et fonctions des protéines virales.
- Figure 6 :** Analyse phylogénétique des séquences nucléotidiques d'une partie  
de NS5B chez des individus infectés provenant des 5 continents
- Figure 7:** Distribution mondiale des génotypes VHC
- Figure 8:** Représentation schématique du système réplicon VHC
- Figure 9:** Production de pseudo-particules VHCpp
- Figure 10:** Représentation schématique du système VHCcc
- Figure 11:** Cycle de vie du VHC.
- Figure 12:** Modèle de formation du complexe d'initiation de la traduction  
médiée par l'IRES du VHC
- Figure 13:** Réseau membranaire siège de la réplication du VHC et modèle de  
Formation du CR du VHC
- Figure 14:** Modèle d'assemblage et sécrétion des particules virales du VHC
- Figure 15:** Modèle pour la production de virions infectieux du VHC.
- Figure 16:** Evolution d'une hépatite causée par le VHC.
- Figure 17:** Arbre phylogénétique de la famille des septines humaines
- Figure 18:** Structure générale des septines chez les mammifères
- Figure 19:** Schéma général du processus de Sumoylation.
- Figure 20 :** Structure des protéines PIAS

# LISTE DES ABBREVIATIONS

## LISTE DES ABREVIATIONS

|                   |                                                                                      |
|-------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>3'NC</b>       | Région 3' non codante                                                                |
| <b>5'NC</b>       | Région 5' non codante                                                                |
| <b>ADN</b>        | Acide désoxyribonucléique                                                            |
| <b>ALAT</b>       | Anine aminotransférase                                                               |
| <b>ARN</b>        | Acide ribonucléique                                                                  |
| <b>ApoB</b>       | Apolipoprotéine B                                                                    |
| <b>ApoE</b>       | Apolipoprotéine E                                                                    |
| <b>ARFP</b>       | Alternative Reading Frame Protein                                                    |
| <b>CLDN-1</b>     | Protéine Claudine 1                                                                  |
| <b>CHC</b>        | Carcinome Hépatocellulaire                                                           |
| <b>eIF2</b>       | Eukaryotic Initiation Factor 2                                                       |
| <b>eIF3</b>       | Eukaryotic Initiation Factor 3                                                       |
| <b>EMCV</b>       | Virus de l'encéphalomyocardite                                                       |
| <b>GL</b>         | Gouttelette Lipidique                                                                |
| <b>HDL</b>        | Lipoprotéine de forte densité                                                        |
| <b>HVR</b>        | Hypervariable Region                                                                 |
| <b>IFN</b>        | Interféron                                                                           |
| <b>IRES</b>       | Site interne d'entrée des ribosomes                                                  |
| <b>LDL</b>        | Lipoprotéine de faible densité                                                       |
| <b>LDL-R</b>      | Récepteur des lipoprotéines de faible densité                                        |
| <b>L-SIGN</b>     | Liver/lymph node-Specific Intracellular<br>adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin |
| <b>NS</b>         | Protéines non structurales du VHC                                                    |
| <b>ORF</b>        | Open reading frame                                                                   |
| <b>PCAF</b>       | P300/CBP Associated Factor                                                           |
| <b>PEG</b>        | Polyéthylène-Glycol                                                                  |
| <b>PH</b>         | Pleckstrin Homology                                                                  |
| <b>Protéine F</b> | F pour Frameshift                                                                    |
| <b>RE</b>         | Reticulum Endoplasmique                                                              |
| <b>RT</b>         | Reverse transcription                                                                |
| <b>SR-BI</b>      | Scavenger Receptor type B class I                                                    |
| <b>STAT</b>       | Specifically Targeted Antiviral Therapy                                              |
| <b>SNP</b>        | Single-nucleotide polymorphism                                                       |
| <b>VHB</b>        | Virus de l'hépatite B                                                                |

## **LISTE DES ABREVIATIONS**

**VHC**

Virus de l'hépatite C

**VIH**

Virus de l'immunodéficience humaine

ABSTRACT

## **ABSTRACT**

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the fifth most common cause of cancer worldwide and the third most common cause of cancer mortality. HCC is one of the few cancers with well-defined major risk factors. Major causes of HCC include hepatitis B, hepatitis C, alcoholic liver disease, nonalcoholic, steatohepatitis, hereditary hemochromatosis, and genetic alteration. The multifactorial causes of HCC might explain its complex molecular pathogenesis.

Detailed understanding of epidemiologic factors and molecular mechanisms associated with HCC ultimately could improve our current concepts for screening and treatment of this disease.

With a view toward current concepts for screening of this disease, first, we analyzed a genetic susceptibility to hepatocellular carcinoma. The aim of the current study was to assess the impact of the Ile997Val in EP300 and Asn386Ser in PCAF polymorphisms on the risk of HCC. we found that the Val/Val of the EP300 at codon 997 and Ser/Ser of the PCAF at codon 386 were associated with an increased risk of HCC in the Moroccan population. A higher risk of HCC was observed in HCV-negative subjects. We also found that male with Ser/Ser in the PCAF gene and women with Val/Val genotype of the EP300 had a higher risk to develop HCC. It appears that variants of the transcriptional coactivator genes (EP300 and PCAF) may influence HCC risk in populations with low mutations or chromosomal instability rates. Additional surveys are warranted to confirm this first report.

The incidence of HCC is increasing in Western countries, mostly because of the high prevalence of hepatitis C virus (HCV) infection. In this sense, we have tried to identify new host factors involved in replication of HCV. Hepatitis C virus (HCV) replicates in the liver, and chronic infection often leads to cirrhosis, steatosis, and hepatocellular carcinoma. There is no vaccine to protect against HCV infection. Major improvement has been recently achieved regarding treatment of HCV infection however there is already evidence for emergence of resistance due to the high genetic variability of the HCV RNA genome. Thus it should be important, to design therapies which avoid genotypic resistance by targeting cellular proteins. Understanding the mechanisms that allow proper assembly and intracellular trafficking of HCV proteins may have a profound impact on the treatment efficacy. An important hallmark of chronic HCV infection is liver steatosis associated with the accumulation of lipid droplets (LDs). The LDs accumulated in the HCV infected cells and the HCV core protein induces the

## **ABSTRACT**

redistribution of LDs, through the clustering of these organelles in the perinuclear area, providing a platform for virus assembly and in the production of infectious particles.

Several host proteins have been proposed to facilitate the replication of HCV however much is needed to elucidate the implicated mechanisms. Here we report that HCV infection increases expression and formation of septin 9 filament surrounding HCV core.

Data of our study revealed the highest expression of septin 9 in samples from hepatocellular carcinoma (HCC) from patients with chronic HCV infection. Indeed, we brought new perception of septin 9 function regarding both microtubule and lipid structure organization.

We proposed that HCV infection conducts to assembly of septin 9 in filaments through PIAS1. This may provide scaffolds to organize the microtubules network and LDs redistribution required for HCV assembly and replication.

This study illuminates a new function of septin 9 in HCV life cycle through its association with lipids and microtubules. These events might depend on septin 9 SUMO1 modification by PIAS1. These findings also provide a step forwards in understanding the relationship between HCV and its host and open new therapeutic directions



## **INTRODUCTION**

Au cours des trente dernières années, les avancées technologiques en biologie moléculaire et en génétique humaine ont favorisé l'acquisition rapide des connaissances sur le vivant. Ce savoir a entre autres permis une meilleure compréhension de l'étiologie de nombreuses maladies humaines, amenant ainsi, pour certaines, à des possibilités de traitements efficaces.

Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est la tumeur maligne primitive du foie la plus fréquente (80% à 90 % des cas), qui se développe à partir de cellules hépatiques. Le CHC est le cinquième cancer par ordre de fréquence à l'échelon mondial, la troisième cause de décès par cancer dans le monde entier et son incidence est actuellement croissante. Le CHC se développe habituellement sur une cirrhose, plus rarement sur une hépatopathie chronique non cirrhotique, exceptionnellement sur un foie sain. La nature du foie sous-jacent est donc l'élément central dans la survenue et la prise en charge du CHC. Les facteurs prédictifs de survenue de CHC ainsi que les facteurs étiologiques de ce cancer sont multiples, souvent intriqués. Les principaux sont: le sexe masculin, l'âge supérieur à 50 ans, l'insuffisance hépatique, l'hypertension portale (HTP), l'existence d'une cirrhose, l'infection par le virus de l'hépatite B (VHB) et/ou le virus de l'hépatite C (VHC), l'alcool, l'exposition à l'aflatoxine et l'hémochromatose génétique. De grands progrès ont été réalisés ces vingt dernières années dans le diagnostic et le traitement du CHC. L'ensemble des spécialistes s'accordent sur le fait qu'un diagnostic précoce et précis, ainsi qu'une compréhension des facteurs de risque impliqués, augmente considérablement les possibilités de guérison.

Les travaux de thèse en cotutelle menée entre l'Université Mohammed V- Rabat- MAROC et l'Université Paris Sud 11-France et présentés dans ce manuscrit ont porté essentiellement sur l'étude de deux facteurs de risque impliqués dans le développement du carcinome hépatocellulaire ; le polymorphisme génétique des gènes p300 et pcaf et l'infection par le virus de l'hépatite C.

Dans un premier temps, ce travail de recherche s'est focalisé sur l'éventuelle relation entre certains polymorphismes génétiques des gènes pcaf et p300 et le carcinome hépatocellulaire, afin de déterminer si ces polymorphismes constituent un terrain à risque pour le carcinome hépatocellulaire.

Par la suite, une partie de mes travaux a consisté à mieux caractériser la variabilité génétique du VHC et l'épidémiologie des souches virales chez la population marocaine pour lesquelles peu de données sont disponibles. Les analyses phylogénétiques des régions NS5B et E2 et les données épidémiologiques recueillies ont permis de répondre à ces questions.

## **INTRODUCTION**

Enfin, La dernière partie des travaux de cette thèse en cotutelle a visé à identifier des facteurs cellulaires essentiels à la réplication du VHC, dans l'objectif est de définir de nouvelles cibles thérapeutique pour le traitement des hépatites virales C.

L'introduction fait le point sur les connaissances actuelles concernant le CHC et ses facteurs de risques tels que le VHC, les résultats inhérents à mes travaux sont présentés sous forme d'articles scientifiques, en révision ou soumis à la publication, finalement la dernière partie présente les conclusions et les perspectives liées à ces sujets.

## **INTRODUCTION**

### ***I. LE CARCINOME HEPATOCELLULAIRE (CHC)***

#### ***A. Données épidémiologiques***

Le carcinome hépatocellulaire est le cancer primitif du foie le plus courant, il est le cinquième cancer par ordre de fréquence et la troisième cause de mortalité par cancer dans le monde entier. L'incidence annuelle à l'échelle du globe est estimée à environ un million nouveaux cas par/ an [1], la France, compte environ 30.000 nouveaux cas/an [2]. Le CHC est actuellement la cause de décès la plus fréquente des patients cirrhotiques [1]

Le CHC est plus fréquent chez l'homme que chez la femme (sex-ratio de 4 à 9 hommes pour 1 femme) et l'incidence de la maladie croît de façon linéaire avec l'âge [3,4]. Le pic de fréquence se situant de façon variable selon l'ethnie et la géographie: 40 ans chez les africains du Sud, 50 ans dans le sud-est asiatique et 60 ans en France. L'augmentation importante de l'incidence du CHC s'explique par l'épidémie des hépatites virales B et C.

#### ***B. Données physiopathologique***

Le lien entre le CHC et la cirrhose hépatique est bien établi : il est connu de longue date qu'une forte proportion de patients cirrhotiques développe un CHC cliniquement diagnostiqué (Plus de 90% des CHC se rencontrent dans des foies cirrhotique) [5]. L'hypothèse est que l'inflammation chronique augmente les mutations d'ADN et que la prolifération accrue des hépatocytes dans les nodules de régénération augmente la probabilité de mutations oncogènes. Mais il existe également des CHC qui se développent sur des foies non cirrhotiques, par ex. chez des patients porteurs d'une hépatite B non cirrhogène, ou ayant un foie sain sans aucun facteur de risque. Le CHC se développe dans la majorité des cas sur un foie préalablement lésé par l'alcool et/ou le fer suggérant que la maladie chronique du foie est en elle-même, plus que son agent étiologique, un facteur prédominant d'hépatocarcinogenèse [6].

#### ***C. Facteurs étiologiques du carcinome hépatocellulaire***

Le CHC est une maladie plurifactorielle dont les mécanismes de survenue sont encore mal connus. Les principaux facteurs de risque en plus de la cirrhose sont : les infections chroniques par les virus de l'hépatite B (VHB) et C (VHC), l'alcoolisme et l'hématochromatose. De plus, des carcinogènes chimiques comme l'aflatoxine B1 jouent un rôle très important dans le développement du CHC. D'autres facteurs ont également été identifiés, mais leurs rôles dans le développement du CHC est mal caractérisé, il s'agit en particulier de facteurs hormonaux ou de certaines maladies métaboliques [7].

## **INTRODUCTION**

### ***1) Facteur non viraux***

Les facteurs prédictifs de survenue de CHC ainsi que les facteurs étiologiques de ce cancer sont multiples, souvent intriqués. Les principaux sont: le sexe masculin, l'âge supérieur à 50 ans, l'insuffisance hépatique, l'alcool, l'exposition à l'aflatoxine et l'hémochromatose génétique [8].

#### ***a. L'alcool***

La consommation excessive d'alcool qui représente une cause majeure de cirrhose dans les pays développés peut être la cause principale des CHC lorsque la prévalence de l'infection virale est faible [9]. Cependant, il n'est pas certain que l'alcool soit un carcinogène vrai ou qu'il agisse en tant que cofacteur en présence d'une infection coexistante avec le VHB et/ou le VHC. Plusieurs études épidémiologiques centrées sur des sujets alcooliques ont décrit une forte présence des marqueurs de VHB (16%-70%) et du VHC (10%-20%). Ces prévalences sont encore plus hautes chez les patients alcooliques ayant un cancer primitif du foie (27% à 81% de marqueurs de VHB et 50% à 77% de marqueurs de VHC), suggérant une interaction complexe entre l'alcool et les infections virales en termes d'étiologie du cancer primitif du foie [10]. En résumé, la consommation excessive d'alcool est une cause majeure de cirrhose et de CHC surtout en Amérique du Nord et en Europe, notamment en France [250]. Le rôle carcinogène direct de l'alcool est fortement suspecté mais non démontré de façon indiscutable [11].

#### ***b. L'hémochromatose***

L'hémochromatose est une anomalie héréditaire, caractérisée par une absorption et un stockage excessifs de fer dans l'organisme. L'hémochromatose héréditaire est un des facteurs de risque du CHC. Ce risque est estimé à 200 fois celui de la population générale [12]. Il est d'autant plus important que le sujet est de sexe masculin, âgé de plus de 50 ans, alcoolique et/ou tabagique chronique, ayant eu un contact antérieur avec les virus des hépatites B et/ou C, avec une importante surcharge en fer [13]. Expérimentalement, le fer est carcinogène à la fois par des effets directs (en favorisant les altérations de l'ADN) et indirects (formation d'espèces réactives de l'oxygène, lipoperoxydation, stimulation de la fibrogenèse) [14].

## **INTRODUCTION**

### ***c. L'aflatoxine B1***

L'aflatoxine B1 est une mycotoxine, faisant partie de la famille des difurane-coumaris produits comme métabolites secondaires par l'*Aspergillus flavus* et champignons similaires. Les hommes peuvent être mis en contact avec cette toxine par l'ingestion d'aliments contaminés ou d'animaux qui ont ingéré des céréales contaminées. Les zones à haute exposition à l'AFB 1 (Afrique sub-saharienne et sud-est de l'Asie) étaient superposées à celles de haute endémie pour le VHB. Des études ont conclu que l'aflatoxine a un rôle dans la genèse du CHC seulement chez les patients ayant une hépatite chronique B préexistante. En effet, chez les sujets Ag HBs positif, l'AFB 1 peut provoquer l'apparition d'une mutation ponctuelle au niveau du gène suppresseur de tumeurs P 53 [15].

### ***d. Le Tabac***

L'association entre tabac et CHC est théoriquement possible, il a été montré que le tabagisme augmente le risque de carcinome hépatocellulaire en augmentant la sévérité des lésions hépatiques au cours de l'hépatite C chronique et la cirrhose biliaire primitive [16]. L'implication directe du tabac dans la survenue du CHC n'est pas clairement établie, mais des travaux épidémiologiques complémentaires sont nécessaires pour étudier le rôle de la durée et de l'intensité d'exposition au tabac dans le risque d'apparition de CHC.

### ***e. Autres facteurs influençant la survenue du CHC***

#### ***i. Surpoids, diabète et stéato-hépatite non alcoolique***

Récemment plusieurs études ont établi un lien entre le CHC, l'obésité [17] et le diabète [18]. Un risque accru a été démontré chez des patients de sexe masculin, mais il semble dépendre de l'existence d'un alcoolisme chronique ou d'un diabète associé [19]. Des études ont montrées que le diabète était associé à une incidence élevée du CHC et représentait un facteur de risque de CHC indépendant de l'âge, du sexe et de l'ethnie [18,20].

#### ***ii. Facteurs démographiques***

Certaines études en Europe et au Japon réalisées sur des malades ayant un CHC et une intoxication alcoolique majeure, considèrent l'âge supérieur à 50 ans comme facteur majeur influençant la survenue de CHC. Ceci est dû probablement à la longue durée d'évolution nécessaire pour parvenir au stade de cirrhose [21,22]. En revanche, le CHC survient plus précocement chez les sujets infectés par le VHB d'origine asiatique ou africaine, souvent

## **INTRODUCTION**

contaminés dans la période néonatale [23]. Le sexe masculin est également un facteur de risque trouvé dans la plupart des études [21,22]. L'incidence du CHC est généralement 2 à 4 fois plus fréquente chez les hommes que chez les femmes. Ceci pourrait s'expliquer par une différence d'exposition aux facteurs de risque tels que les infections virales et l'alcool ou bien par un rôle carcinogène des hormones sexuelles, notamment les androgènes.

### ***2) Les Altérations génétiques et le cancer***

Le cancer est une maladie génétique de la cellule. En effet, la transformation tumorale d'une cellule est un processus clonal, procédant par des étapes successives constituées, en général, de mutations ; la cellule ayant franchi l'une de ces étapes a acquis un avantage sélectif par rapport à ses congénères. Ces étapes permettent à la cellule d'acquérir la capacité de survie et l'augmentation de la prolifération, à travers la perte du contrôle de l'arrêt du cycle cellulaire, l'inhibition de l'apoptose et de la différenciation ou, encore, l'acquisition de capacités angiogéniques et métastatiques. Ces étapes cellulaires d'évolution clonale sont des mutations (ou des modifications épigénétiques) de gènes dont le produit participe dans une, voire plusieurs voies cellulaires impliquées dans les processus cités plus haut. Ces mutations peuvent être activatrices, conduisant à une hyperactivité de la protéine correspondante (amplification génique), à son expression constitutive (mutation faux-sens) ou à la création d'une nouvelle protéine (fusion génique). La mutation d'un seul allèle suffit à conférer un avantage sélectif à la cellule ; le gène cible de cette mutation est un gène « oncogène ». À l'inverse, il peut s'agir de mutations inactivatrices (stop, insertion ou délétion de quelques nucléotides, anomalies d'épissage, réarrangements de grande taille du gène...). Les gènes cibles de ces mutations inactivatrices sont des gènes « suppresseurs de tumeur ». L'acquisition de mutations dans les gènes oncogènes ou suppresseurs de tumeur peut être secondaire aux erreurs de réplication de l'ADN survenant lors de chaque division cellulaire ; elle est naturellement favorisée par l'exposition de la cellule aux agents mutagènes. On comprend ainsi que des mutations dans les gènes de réparation de l'ADN, mais aussi dans les gènes impliqués dans la stabilité des chromosomes, aient également un rôle clé, bien qu'indirect, dans le processus tumoral, en augmentant le taux de mutations dans les gènes oncogènes ou suppresseurs de tumeurs, et donc la probabilité de voir émerger un processus tumoral. Une grande partie de la recherche a aujourd'hui pour objectif d'identifier, dans les différents cancers, les gènes mutés (et donc les voies cellulaires altérées), ainsi que les gènes de stabilité (ou réparation) du génome. En 2004, près de 300 gènes (soit environ 1 % du

## **INTRODUCTION**

génome), impliqués directement ou indirectement dans l'oncogénèse, ont été identifiés (projet COSMIC : <http://www.sanger.ac.uk/CGP/>).

Dans le carcinome hépatocellulaire, des anomalies chromosomiques ont été détectées. Certaines études ont identifié les bras chromosomiques les plus fréquemment perdus, il s'agit des chromosomes: 17p, 8p, 16q, 16p, 4q, 9p, 13q, 1p, et 6q. La mise en évidence de pertes alléliques suggère l'existence de gènes suppresseurs de tumeur localisés sur ces bras chromosomiques. En effet, la perte d'une des deux copies de ces gènes constitue un des deux événements génétiques impliqués dans leur inactivation. D'autres études ont signalés des gains fréquents au niveau des chromosomes 1q, 7q, 8q et 17q [24, 25, 26, 27]. Des délétions sans effet sur la progression tumorale surviennent fréquemment dans les cellules tumorales du fait de leur instabilité génomique. Des délétions à fréquence basse peuvent donc ne pas intervenir dans la pathogénèse hépatique.

Plusieurs études ont mis en évidence des altérations génétiques des différentes voies de signalisation dans le CHC ; Voie de signalisation p53 [28, 29, 30], Voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine [31, 32], Voie de signalisation du gène du rétinoblastome [31, 32], Voie de signalisation du transforming growth factor beta (TGF $\beta$ ) [33], Activation de la voie Ras [34, 35], et enfin, l'activation de la Voie de signalisation JAK/STAT [36]. Ces mécanismes ont été élucidés à la fois dans les tumeurs humaines, dans des modèles animaux et in vitro [37].

Aussi des études ont incriminé le rôle de certains polymorphismes d'enzymes impliquées dans la synthèse de molécules qui régulent la prolifération cellulaire ou l'apoptose [22]. La notion de prédisposition génétique au cancer est une notion relative : elle correspond à une augmentation du risque de cancers, chez une personne, par rapport au risque moyen observé dans la population générale. Cette augmentation peut être mesurée par le risque relatif ; autrement dit, si l'on revient au processus biologique de la transformation cellulaire, il s'agit de situations où le quota de mutations nécessaire à la transformation cellulaire est atteint plus rapidement.

### ***3) Les polymorphismes génétiques et le cancer.***

Il s'agit d'une variation dans la séquence nucléotidique retrouvée dans plusieurs individus d'une même espèce, qui se transmet de façon mendélienne. On distingue tout d'abord les substitutions d'une base, ou SNP (pour « Single Nucleotide Polymorphism »), qui représentent à elles-seules 90% de l'ensemble des variations génétiques humaines. En effet,

## **INTRODUCTION**

sur les 3 milliards de paires de bases du génome humain qui contiennent environ 30000 gènes, à ce jour, plus de 9 millions de SNP ont été identifiés [38]. La plupart sont bi-alléliques et se caractérisent par la fréquence de l'allèle minoritaire, ou allèle variant. On qualifie communément de mutation ponctuelle un SNP dont la fréquence de l'allèle variant est inférieure à 1%. Parmi les autres types de polymorphismes, beaucoup moins fréquents, on distingue les insertions/délétions et les microsatellites et les variations du nombre de copies ou CNV (pour « Copy Number Variation ») [39].

Les polymorphismes génétiques peuvent influencer l'expression génique et la fonction protéique. L'impact fonctionnel d'un polymorphisme génétique dépend fortement de sa localisation. On retrouve des polymorphismes génétiques dans les zones codantes (exons), où ces variations de séquence peuvent être silencieuse ou amener à un changement de phénotype par la production d'une protéine différente, mais aussi dans les régions non codantes (introns, promoteurs, régions non traduites de l'ARN,...) où ils peuvent avoir des conséquences sur l'épissage, la transcription, ou encore sur la stabilité des ARN. L'importance du polymorphisme génétique a été mise en évidence dans les infections bactériennes et virales [40, 41, 42].

Le développement du carcinome hépatocellulaire est un processus complexe, impliquant plusieurs facteurs de risque, tels que les infections virales par le VHB et/ou le VHC, l'alcoolisme, l'exposition à l'aflatoxine B1. Par contre une proportion de patients atteints de CHC ont développé ce cancer sans être exposés aux facteurs de risque cités plus haut, ce qui suggère l'implication des facteurs génétiques dans la susceptibilité de ces patients à développer un CHC. Plusieurs gènes de susceptibilité au CHC ont été identifiés, parmi eux le codon 72 du gène p53 [295].

### ***a. Les études d'association.***

Elles ont pour but d'étudier statistiquement les liens entre un polymorphisme génétique et un phénotype particulier (expression du gène, fonction de la protéine associée ou événement clinique). L'étape principale est la détermination du génotype de chaque individu. Ainsi par exemple, pour un SNP bi-allélique (a allèle le plus fréquent et b allèle le moins fréquent encore appelé allèle mineur), on déterminera pour chaque individu si il est homozygote (a/a), hétérozygote (a/b) ou homozygote pour l'allèle mineur (b/b). Il faut ensuite faire une étude statistique comparant la fréquence du phénotype pour chaque groupe de génotypes.



## **INTRODUCTION**

En ce qui concerne les études d'association avec des événements cliniques, il est nécessaire de respecter certaines conditions avant de statuer sur le lien causal entre un polymorphisme et l'événement étudié. En effet, une association statistique peut être due à un biais de l'étude, à un coup de chance, ou encore à l'effet d'un autre polymorphisme génétique en déséquilibre de liaison avec celui étudié. Elle ne deviendra donc lien causal plausible que si elle est mise en évidence sur plusieurs grandes cohortes indépendantes de patients, après analyse des éventuels déséquilibres de liaison, et surtout s'il a été rapporté un impact fonctionnel de ce polymorphisme sur le gène et/ou la protéine associés. S'appuyer sur des données de fonctionnalité biologique publiées permet de renforcer la suspicion de lien causal.

### ***b. Les études gènes candidats.***

Il y a quelques années, les études d'association s'intéressaient à des polymorphismes de gènes candidats connus pour coder des protéines suspectées de jouer un rôle dans le ou les phénotypes étudiés. Il s'agit de la méthode utilisée dans notre travail. Plusieurs sources peuvent contribuer au choix de ces gènes : les connaissances physiopathologiques, les modèles animaux, les données issues de l'analyse du transcriptome ou la recherche à partir de la littérature et des bases de données. Pour un gène candidat, l'étude peut soit concerner un ou plusieurs polymorphismes déjà caractérisés dans la littérature, soit comprendre une étape de caractérisation de la variabilité de la séquence. Cependant, dans les études d'association traditionnelles, les gènes candidats sont sélectionnés a priori sur la base de la fonction biologique de la protéine codée, ce qui exclut tous les gènes inconnus ou dont le rôle est insoupçonné.

Dans un premier temps, ce travail de recherche s'est focalisée sur l'éventuelle relation pouvant lier les polymorphismes génétiques des gènes PCAF et P300 au carcinome hépatocellulaire. Sur le plan génétique nous avons constaté que le génotype Val/Val de p300 et le génotype Ser/Ser de pcaf apparaissent comme les plus associés à l'hépatocarcinome. Par ailleurs, ces derniers présentent une susceptibilité génétique significative au carcinome hépatocellulaire.

## **INTRODUCTION**

### ***i. P300, structure et fonctions***

La protéine p300 (KAT3b) est une histone acétyltransférase (HAT). Elle a été caractérisée pour la première fois par son interaction avec l'oncoprotéine adénovirale E1A (Eckner *et al*, 1994), et elle forme avec son paralogue CBP (CREB Binding Protein) un complexe protéique appelé CBP/p300. CBP et p300 présentent entre elles une grande similitude de séquence sur toute leur longueur et se sont avérées interchangeables dans la plupart de leurs fonctions.

L'analyse structurale de ces deux protéines a permis de mettre en évidence plusieurs régions très conservées [308] (**Figure1**). CBP/p300 contient un bromo-domaine (motif de reconnaissance des lysines acétylées) qui peut être impliqué dans certaines interactions entre protéines et pourrait jouer un rôle dans l'assemblage des complexes menant à l'activation de la transcription et un domaine PHD qui leur confèrent la capacité de s'associer aux modifications d'histones. En plus du domaine catalytique HAT, elles comportent un grand nombre de domaines d'interactions protéiques tels que les domaines CH1 (ou TAZ1), KIX, CH3 (ou TAZ2), et SID, ce qui leur permet d'interagir avec plusieurs centaines de partenaires différents.

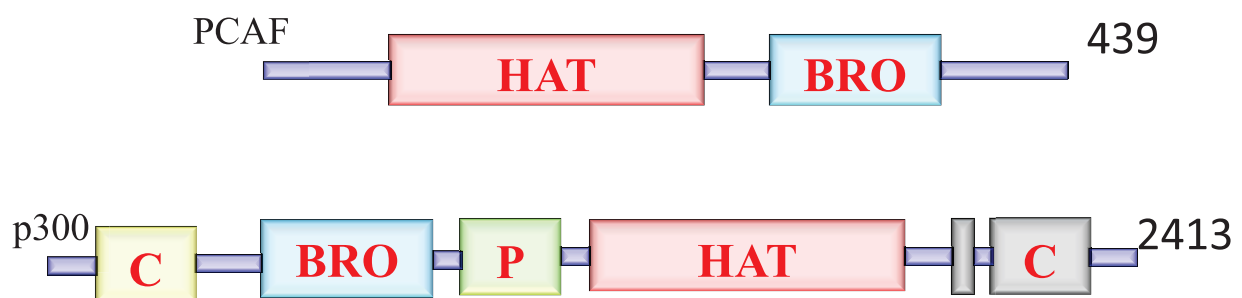
p300 a été fortement étudiée et est impliquée dans un grand nombre de fonctions biologiques diverses et variées telles que la prolifération cellulaire, la régulation du cycle cellulaire, l'apoptose, la différenciation et la réponse aux dommages de l'ADN [308]. La première fonction de p300 est d'agir en tant que cofacteur de la transcription pour un grand nombre de protéines nucléaires tels que NF- $\kappa$ B, c-Fos, E2F. Elle interagit également avec les facteurs de transcription basale TBP et TFIIB et/ou forme un complexe avec l'ARN polymérase II [299]. De plus, elle est capable d'interagir avec des oncogènes connus (myb, jun, fos), des protéines virales de transformation (E1A, E6,Tax) et des protéines suppresseurs de tumeurs (p53, Rb, Smads, RUNX et BRCA1) [309]. Le second aspect important de la fonction de p300 est la capacité d'agir en tant qu'histone-acétyl-transférase, grâce à son domaine HAT, permettant ainsi d'acétyler les histones des nucléosomes situés au niveau des promoteurs de gènes, et décompacter la chromatine, ce qui favorise par la suite, un accès plus facile à la machinerie transcriptionnelle et le recrutement de facteurs chromatinien [310]. Enfin, des mutations au niveau du gène p300, aussi bien que des translocations chromosomiques, ont pu être observées pour de nombreuses tumeurs chez les humains [311], ce qui suggère une activité suppresseur de tumeurs pour cette protéine.

## INTRODUCTION

### *ii. PCAF, structure et fonction*

PCAF (p300/CREB-binding Associated Factor) a été identifiée à l'origine par sa capacité à interagir avec CBP/p300 [299]. Elle se caractérise par la présence d'un domaine HAT et d'un bromo-domaine (**Figure 1**), et semble exercer un rôle d'adaptateur et d'acétyler les histones. si le domaine HAT est bien sûr indispensable à la fonction d'acétylation, le bromo-domaine semble capable d'influencer l'activité HAT ainsi que le choix du substrat [300]

Le rôle de la protéine PCAF dans la régulation de la transcription a été beaucoup étudié. En tant que HAT et coactivateur, cette protéine semble impliquée dans la myogénèse [301] ainsi que dans l'activation de la transcription par les récepteurs nucléaires [302] ou par certains facteurs de croissance [303]. PCAF et l'oncoprotéine E1A lient une région commune au niveau de p300 et se retrouvent en compétition pour lier ce facteur. En fait, lorsque E1A et PCAF sont transfectés dans des cellules, leurs effets au niveau du cycle cellulaire sont opposés : E1A accélère le cycle cellulaire tandis que PCAF inhibe sa progression [299]. En outre, E1A réduit la transcription médiée par PCAF *in vivo* en se fixant directement sur PCAF [304]. Outre sa capacité à acétyler les histones, la protéine PCAF cible divers substrats comme p53 [305], MyoD [306], Tat [307], ainsi que les facteurs généraux de transcription TFIIE et TFIIIF, ce qui module la fonction de ces protéines.



**Figure 1 : Organisation structurale de PCAF et p300**

## **INTRODUCTION**

En résumé PCAF a été identifié via sa capacité d'interagir avec p300, et cette interaction est importante pour l'activation transcriptionnelle de plusieurs gènes. Ce qui suggère que p300 et PCAF sont, ainsi, des gènes avec une pertinence biologique forte pour la carcinogenèse, laissent supposer que ces gènes sont de bons candidats pour une étude d'association au carcinome hépatocellulaire.

### ***4) Facteurs viraux***

#### ***a. Association VHB et CHC***

Des études épidémiologiques ont clairement montré l'association entre l'infection par le virus de l'hépatite B et la survenue du CHC indépendamment de la cirrhose [43, 44]. L'association entre le VHB et le CHC est suggérée par la forte incidence du CHC dans les zones d'endémie virale et par les études montrant que les sujets porteurs de l'antigène HBs ou des anticorps anti-HBc avaient plus fréquemment un CHC que les patients sans marqueur viral [43,44]. Enfin, les techniques de virologie moléculaire, sont venues confirmer les données épidémiologiques. La détection par PCR de séquences virales d'ADN du VHB dans le sérum et le foie de sujets atteints de CHC a montré la forte prévalence de l'infection virale B, quelle que soit la région examinée et le statut sérologique vis à vis de l'AgHBs [45, 46]. Le VHB a un potentiel carcinogène élevé, pour trois raisons. En premier lieu, il peut entraîner une hépatite chronique et donc induire un cycle nécrose-régénération qui peut conduire au développement d'un CHC. En deuxième lieu, il peut s'intégrer dans le génome de l'hôte et donc modifier l'expression de gènes essentiels pour la régulation du cycle cellulaire [46, 47, 48, 49]. En troisième lieu, certains peptides traduits à partir du génome viral comme la protéine HBX sont capables d'activer des promoteurs de certains oncogènes [50, 51, 52].

#### ***b. Association VHC et HCC***

L'association du VHC au CHC a été depuis longtemps évoquée [53, 54]. On estime actuellement qu'environ 80% de sujets infectés par le VHC développent une hépatite chronique, dont 5 à 10 % pourraient aboutir à un CHC [53, 55, 56]. Plusieurs arguments épidémiologiques suggèrent cette association. Avec le test ELISA, il est apparu que les patients avec CHC ont une prévalence nettement augmentée d'anticorps anti-VHC qui varie de 20 à 80% selon les zones géographiques. De plus, il y a d'autres arguments qui soutiennent une relation entre VHC et CHC. Le VHC est reconnu comme l'agent principal des hépatites post-transfusionnelles nonA-nonB et du développement d'un CHC après cirrhose [57]. Le

## **INTRODUCTION**

développement d'une hépatite chronique non-A, non-B suivi d'un CHC a été rapporté chez un chimpanzé infecté 6 ans auparavant avec un plasma humain infecté [58].

Vu l'importance du VHC comme facteur de risque impliqué dans le développement du CHC, les travaux menés à l'institut Pasteur du Maroc et à l'unité Inserm U785 ont consisté, dans un premier temps à mieux caractériser la variabilité génétique du VHC et l'épidémiologie des souches virales chez une partie de la population marocaine pour lesquelles peu de données sont disponibles, et dans un deuxième temps à identifier certains facteurs cellulaires essentiels à la réplication du VHC, dans l'objectif est de définir de nouvelles cibles thérapeutique pour le traitement des hépatites virales C.

## ***II. le virus de l'hépatite C***

### ***A. données épidémiologiques et cliniques***

#### ***1) Découverte de l'agent responsable de la maladie***

Dans les années 70, en développant des tests sérologiques pour la détection des virus de l'hépatite A ou B (VHA ou VHB) chez les patients atteints d'hépatite, Feinstone et ses collaborateurs observèrent que certains patients étaient séronégatifs pour le virus de l'hépatite A et B. Ils en déduisent l'existence d'un agent inconnu pouvant causer des hépatite non A non B (NANBH) [59]. Le terme provisoire d'hépatite « non-A non-B » (NANBH) avait été proposé et la recherche de l'agent causal faisait l'objet de nombreux travaux. L'origine infectieuse de cette nouvelle hépatite a rapidement été suspectée, cette hypothèse étant basée sur l'observation clinique de patients qui avaient reçu des transfusions sanguines et sur l'observation expérimentale de chimpanzés qui avaient été inoculés par des sérums de patients ayant développé une hépatite non-A non-B.

En 1978, Alter et son équipe réussirent à infecter des chimpanzés à partir des sérums de patients ayant une hépatite NANBH [60]. Mais aucune technique classique ne permis pas l'isolement d'antigènes, ou de particules infectieuses.

Au début des années 80, Bradly et Feinstone ont montré que l'agent étiologique majeur des **NANBH** appelé TFA (Tubule Forming Agent) était sensible au chloroforme, suggérant l'existence d'un virus enveloppé. Par la suite, les altérations ultrastructurales des hépatocytes chez le chimpanzé étaient identiques à celle des cellules infectées par des Virus à ARN. Dix ans plus tard, Choo et son équipe produisirent une banque d'expression d'ADNc, à partir du

## **INTRODUCTION**

sérum de chimpanzé infecté par l'agent provoquant des NANBH pour produire une large banque de cDNA qui fut ensuite clonée dans un bactériophage [61]. Cet ingénieux procédé a permis d'identifier les caractéristiques moléculaires de l'agent causal des NANBH. Cette banque d'expression fut alors criblée par des sérums de patients humains atteints de NANBH et porteurs d'anticorps spécifiques. Les auteurs isolèrent le clone 5.1.1, codant un antigène reconnu par les sérums de plusieurs patients. De plus, cette équipe réussit à caractériser le génome du virus, il s'agissait d'un ARN simple-brin codant pour un unique ORF. L'agent causal des NANBH, ainsi identifié, prit alors le nom de VHC. D'un point de vue médical, cette découverte permit de mettre au point un test ELISA pour détecter la présence d'anticorps spécifiques du VHC chez les patients. Une fois le génome du virus caractérisé, de nombreuses études ont permis de préciser la structure secondaire et tertiaire des extrémités 5' et 3' non traduites du génome ou encore de caractériser le mécanisme de clivage de l'unique polyprotéine, ainsi que les différentes fonctions des protéines virales.

En 1992, l'équipe de Nomoto a montré que l'extrémité 5' non traduite contenait une région structurée hautement conservée, correspondant à un site d'entrée interne des ribosomes (IRES) [62].

Néanmoins, les recherches sur le VHC se trouvaient fortement limitées par l'absence de modèle cellulaire, car seul le chimpanzé pouvait être infecté et reproduire une infection et une hépatite proche de celle observée chez l'homme. Une avancée majeure fut la mise au point en 1999 par l'équipe de Ralf Bartenschlager du premier réplicon dérivé du génome de VHC [63]. Il aura fallu attendre 2002 pour que l'équipe de V. Lotteau caractérise une nouvelle forme du virus, jouant un rôle important dans la dissémination virale in vivo : des VLP (Viro-lipido-particles) associant particules virales et VLDL (Very-Low-Density-Lipoprotein) [251]. En 2004, deux découvertes sont venues compléter nos connaissances sur le spectre d'infection de ce virus. En effet, le virus, bien que majoritairement présent dans le foie, a été trouvé dans le système nerveux central [64] et dans l'intestin, où l'infection semble être également productrice de particules virales [252].

En 2005, trois équipes décrivirent un système permettant pour la première fois de reproduire l'intégralité du cycle viral en culture cellulaire [79, 142,147] ouvrant une nouvelle voie pour les recherches fondamentales sur ce virus.

## **INTRODUCTION**

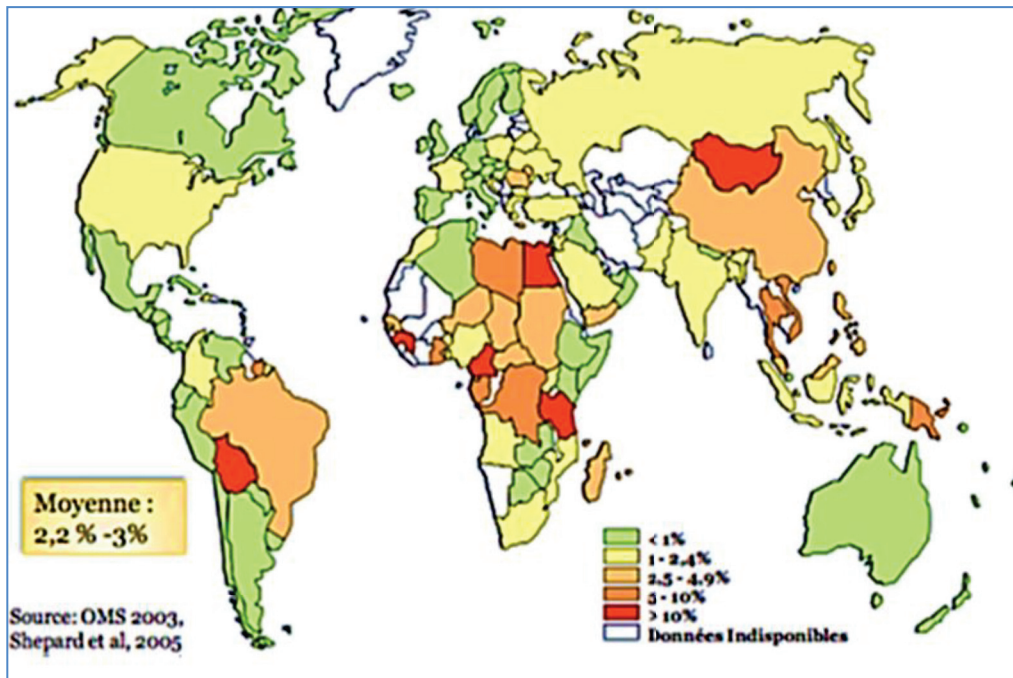
### ***2) Epidémiologie de l'hépatite C***

#### ***a. Prévalence de l'infection***

Le VHC est une cause majeure d'hépatite aiguë et d'affection hépatique chronique. L'estimation de la prévalence de l'infection par le VHC en population générale reste difficile et imprécise notamment du fait de la non-représentativité de la majorité des échantillons de population étudiés. En 1999, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estimait qu'environ 3% de la population mondiale était infectée par le virus de l'hépatite C et qu'au moins 170 millions de porteurs chroniques du virus étaient ainsi exposés aux risques de complications. Des données plus récentes rapportent une prévalence légèrement inférieure et voisine de 2,2% [67]. La distribution géographique est très variable avec des zones à prévalence très élevée comme en Afrique ou en Asie où la prévalence peut dépasser 10% et des régions de basse endémie telles que l'Amérique du Nord ou l'Europe Occidentale avec une prévalence voisine de 1% (**Figure 2**) [332]. Etant donné le caractère le plus souvent asymptomatique de l'hépatite aiguë et l'absence de suivi épidémiologique dans certains pays, il est difficile d'estimer l'incidence de l'infection par le VHC au niveau mondial. L'Europe et l'Amérique du Nord compteraient environ 22 millions de sujets séropositifs pour le VHC contre 147 millions pour le reste du monde dont 32 millions en Afrique [296].

En France, la prévalence de l'infection chronique par le VHC est estimée à environ 1,1% (*Dubois et al, 1997; W.H.O., 1999*). Les actions d'incitation au dépistage ont conduit à une augmentation importante de la proportion de personnes connaissant leur statut sérologique mais la plupart des malades diagnostiqués sont des personnes contaminées de longue date et ce nombre reflète donc probablement plus l'incidence passée que présente. Au Maroc, le taux de prévalence est de l'ordre de 0,5% à 1,5%. On considère que ce virus est responsable d'environ 10 % des cas d'hépatites aiguës et de 80 % des cas d'hépatites chroniques (**Figure 1**). L'hépatite chronique C est une cause majeure de cirrhose et de carcinome hépatocellulaire). L'évolution silencieuse de la maladie et la fréquence élevée de passage à la chronicité explique l'existence d'un grand réservoir de sujets infectés, dont une grande partie ignore son état de séropositivité.

## INTRODUCTION



*Figure 2: Prévalence de l'infection par le VHC estimée par l'OMS en 2003.*

*(Shepard et al., 2005)*

### *b. Modes de contamination*

#### *i. Transmission parentérale*

Dans 60 à 70 % des cas, une transmission parentérale du VHC, résultant d'un contact direct avec le sang contenant le virus, peut être identifiée [68]. Dans ce cadre, les deux principaux modes de transmission sont : la transfusion sanguine et la toxicomanie intraveineuse. Le VHC peut être transmis par le biais d'échanges de seringues, mais aussi de matériel de préparation des drogues, entre toxicomanes intraveineux.

Le risque d'être contaminé par le VHC après avoir reçu des produits sanguins varie en fonction de plusieurs paramètres : le nombre d'unités transfusées, la date de transfusion par rapport à l'introduction des différents marqueurs utilisés pour l'éviction des dons de sang à risque, le type de produits transfusé, le statut des donneurs (rétribués ou volontaires, réguliers ou occasionnels) qui conditionne leur contagiosité. Les concentrés cellulaires des globules blancs et de plaquettes, ainsi que les produits dérivés du sang, tels que plasma frais congelé ou fractions coagulantes, sont susceptibles de transmettre l'infection.



## **INTRODUCTION**

Les mesures de prévention successivement introduites en transfusion ont permis de réduire progressivement le risque de transmission du virus : élimination des unités de sang ayant un taux d'alanine aminotransférase (ALAT) supérieur à 2 fois la normale (avril 1988), puis des unités de sang contenant des anticorps anti-HBc (octobre 1988), des anticorps anti-VHC (mars 1990, mars 1991), enfin l'éviction en 1992 des donneurs dont le taux d'ALAT est strictement supérieur à la normale. Ces mesures ont permis, en France comme à l'étranger, de réduire très significativement le risque transfusionnel de contamination par le VHC.

### ***ii. Transmission sexuelle***

Des modes de transmission mineurs ont été identifiés. La transmission sexuelle du VHC est possible, mais son incidence serait très faible. Dans plusieurs études, la prévalence des marqueurs du VHC étaient plus élevée chez les homosexuels que dans la population générale, mais le rôle de facteurs de risque associés, tels que la toxicomanie intraveineuse, ne peut être écarté. En fait, des marqueurs d'infection par le VHC sont trouvés chez seulement 1 à 6 % des partenaires sexuels réguliers de sujets infectés. Même si cette prévalence reste supérieure à celle observée dans la population générale, elle est relativement faible [297].

### ***iii. Transmission intra-familiale***

La transmission *intra-familiale* du VHC, c'est-à-dire interindividuelle directe entre des sujets vivant sous le même toit et n'ayant pas de rapports sexuels, a été évoquée. Les données de la littérature à ce sujet sont contradictoires. L'hypothèse la plus probable pouvant expliquer ce type de transmission reste la transmission par le sang, résultant de l'utilisation commune aux membres d'une même famille d'objets personnels tels que ciseaux, peignes, rasoirs, voire brosses à dents [297]

### ***iv. Transmission mère-enfant***

La transmission mère-enfant du VHC a, quant à elle, été bien démontrée. Chez les mères également infectées par le VIH, la transmission du VHC est fréquente, de l'ordre de 20 % et elle semble indépendante de celle du VIH. En revanche, chez les femmes non infectées par le VIH, le risque de transmission mère-enfant du VHC apparaît bien faible (de l'ordre de 3 %). Le risque de transmission est d'autant plus élevé que la charge virale, c'est-à-dire la contamination de particules virales circulantes, est élevée chez la mère. Seules les femmes ayant les plus fortes charges virales transmettent le virus à leur enfant. Il s'agirait d'une transmission périnatale (soit au cours de l'accouchement, soit dans la période post-natale)

## **INTRODUCTION**

plutôt qu'une contamination transplacentaire in utero. Les résultats des études à mettre en évidence l'ARN du VHC dans le colostrum ou le lait maternel, sont contradictoires.

### ***v. Infections sporadiques***

Finalement, chez 30 à 40 % des malades ayant une infection par le VHC, aucun facteur de risque d'infection n'est trouvé. La possibilité d'une transmission par les soins dentaires, l'acupuncture, le rasage chez les barbiers, les tatouages, le percement ou diverses manoeuvres instrumentales souvent d'origine nosocomiale (cathétérismes, endoscopies, biopsies per-endoscopiques, chirurgie...) a été évoquée [297]

### ***c. Groupes à risque***

Les groupes à risque d'infection par le VHC résultant de ses modes de transmission :

» ***Les malades transfusés***, surtout s'ils ont été multitransfusés, et les hémophiles ont été très exposés. Avec l'utilisation de produits sanguins viro-inactivés et le remplacement, des fractions coagulantes par des produits recombinants ont pratiquement annulé le risque de transmission du VHC.

» ***Les hémodialysés*** constituent également une population à risque élevé d'infection par le VHC, du fait d'une part des multiples transfusions reçues, d'autre part de transmissions nosocomiales au cours des séances d'hémodialyse.

» de la même façon, ***les transplantés d'organes*** sont soumis à des risques cumulés de contamination virale

» ***Le personnel de santé*** semble moins exposé au risque d'infection par le VHC, elle s'explique sans doute par le fait que le seul mode de contamination possible, du fait de la faible charge virale, est la piqûre avec du sang contaminé.

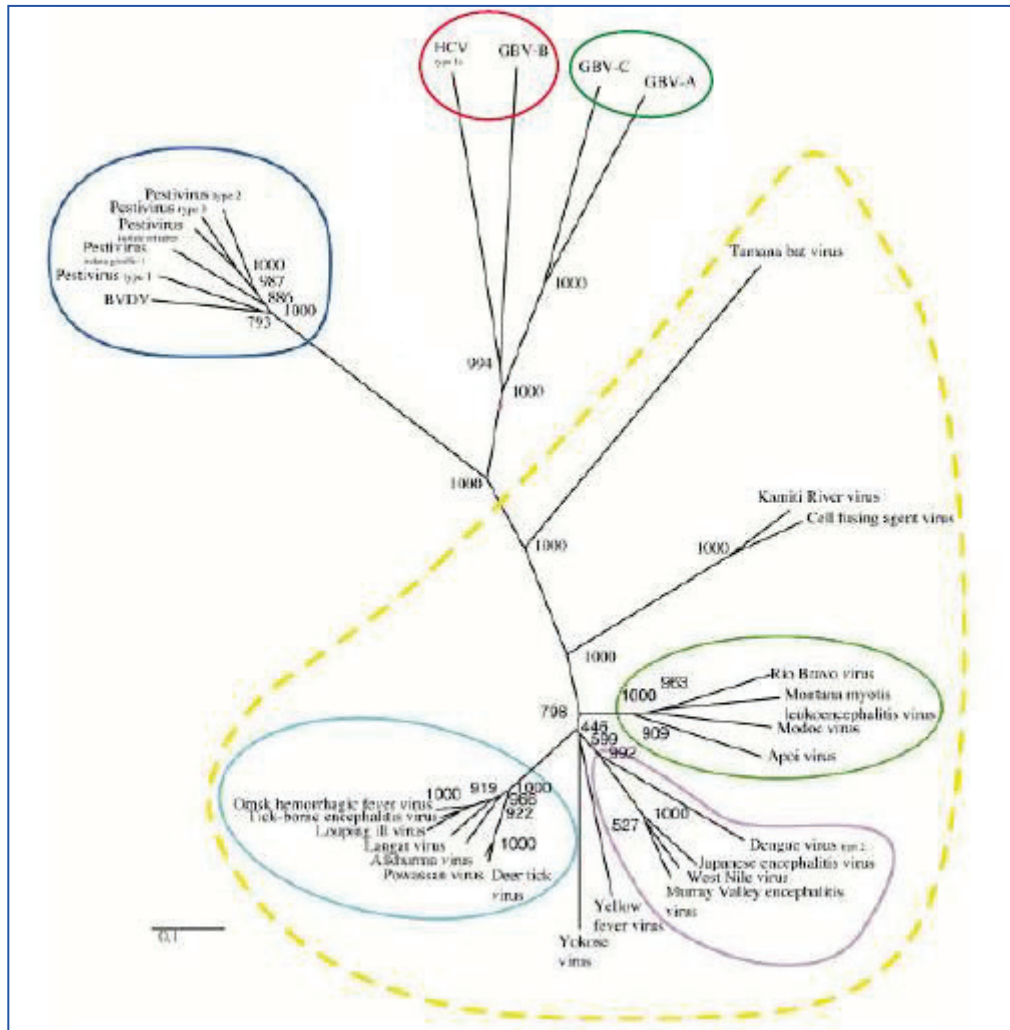
## ***B. Données moléculaires, modèles d'études***

### ***1) Classification***

Le VHC fait partie de la famille des *Flaviviridae*, comprenant les genres *Flavivirus* (composé notamment du virus de la fièvre jaune (YFV) et du virus de la dengue (DV), pathogènes pour l'homme et l'animal), *Pestivirus* (dont font partie le virus de la peste porcine (CSFV) et le virus de la diarrhée bovine (BVDV) qui infectent principalement les animaux d'élevage). Les

## INTRODUCTION

virus hépatotropes GB classés dans cette famille virale, appartiennent quant à eux au genre *Pegivirus* [330] qui regroupe GBV-A, GBV-C et GBV-D [331]. Enfin le genre *Hepacivirus* comprend le HCV et GBV-B et se distingue des autres genres par l'organisation des protéines structurales (**Figure 3**) [329].



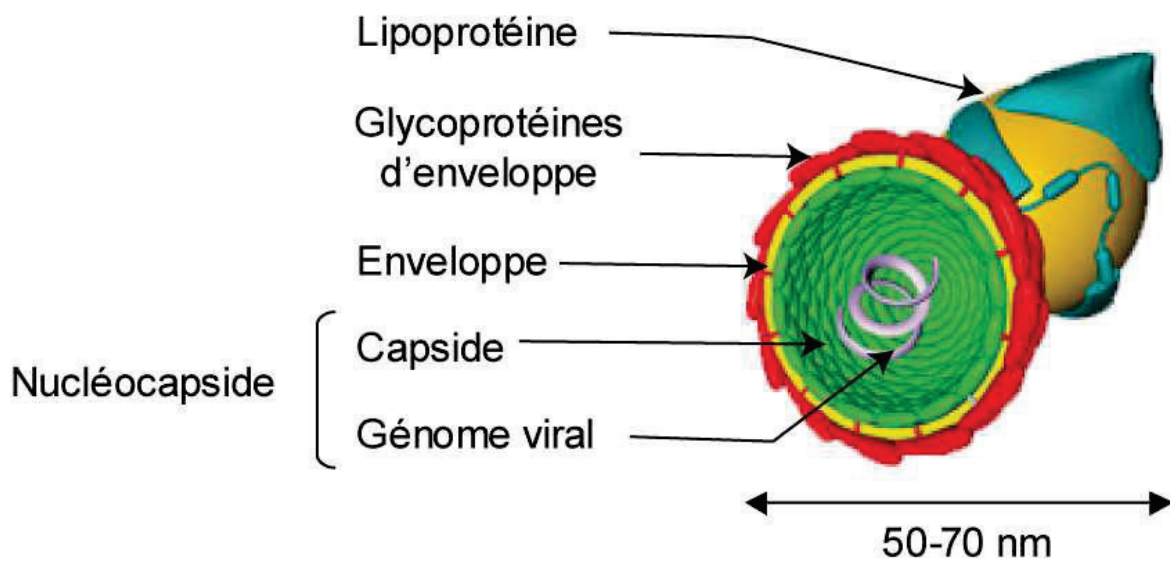
**Figure 3 : Arbre phylogénique de la famille des Flaviviridae (Ferron et al., 2005).** En jaune le genre *Flavivirus*, en bleu le genre *Pestivirus*, en rouge le genre *Hepacivirus* et en vert le genre *Pegivirus*. Le GBV-D récemment découvert n'apparaît pas sur cet arbre.

### 2) Organisation structurale et génomique

Le VHC circule sous diverses formes chez les personnes infectées. Il peut être associé à des lipoprotéines de faible densité (LDL) et de très faible densité (VLDL), circuler sous forme de virions liés à des immunoglobulines ou sous forme libre [69, 70, 71]. Ceci peut expliquer les

## INTRODUCTION

différentes densités de particules virales observées sur gradient de sucrose. L'infectiosité maximale est observée pour une densité de 1,10 g/mL. Plus récemment, la circulation du VHC sous forme de lipo-viro-particules (LVP) a été décrite avec des densités variant de 1,06 à 1,55 g/mL selon la composition des LVP [72]. Ce sont des particules sphériques riches en triglycérides, Apo B ou Apo E contenant la capsid virale et l'ARN à l'intérieur, et les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 à leur surface [73] (**Figure 4**) [333].



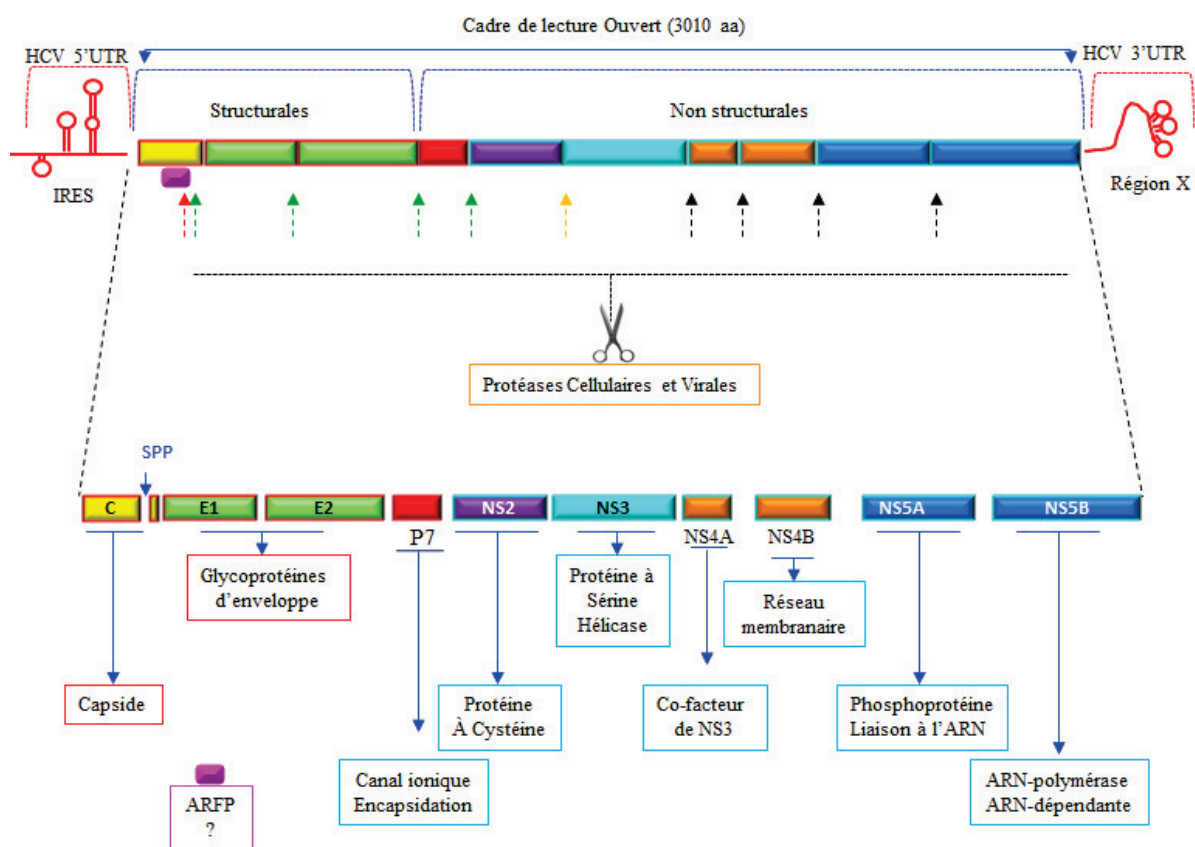
*Figure 4: Structure schématique de la particule virale C (Popescu & Dubuisson, 2010)*

Le génome du VHC est une molécule d'ARN simple brin positif de 9.6 kb et comporte une phase de lecture unique encadrée aux extrémités 5' et 3' de séquences non codantes (**Figure 5**). La région 5' non codante (5'NC) constituée de 341 nucléotides est composée de 4 domaines en tige boucle [253, 254] fixant la sous unité de 40S du ribosome (Internal Ribosome Entry Site, IRES) permettant l'initiation de la traduction [74]. L'IRES couvre une région d'environ 340 nucléotides (nt) qui comprend la majeure partie de 5'NC et 24 à 40 nt de la région codant la protéine C [75, 76]. L'IRES est indispensable à la transcription coiffe-indépendante de l'ARN viral. La région 5'NC, dans les conditions physiologiques, prend une structure tertiaire complexe constituée de 4 domaines. Les domaines II, III et IV sont indispensables à l'activité IRES [77]. Le domaine III permet la liaison à la sous-unité 40S du ribosome et à eIF2 (facteur d'initiation de la transcription eucaryote). Le domaine IV contient

## INTRODUCTION

le codon d'initiation. La relation structure activité de l'IRES est très étroite. Des mutations dans les domaines II ou IV ont peu d'impact sur l'activité de l'IRES, en revanche, des mutations dans le domaine III telles que la G266A ou la G268U peuvent diminuer son activité [78]. La traduction de l'ARN conduit à la synthèse de la polyprotéine virale.

La région 3' non codante constitue le site d'initiation de la synthèse du brin négatif, intermédiaire de la réplication. Elle est constituée d'une région non traduite d'environ 30 nucléotides, d'une région polyuridylée de longueur variable et suivie d'une séquence de 98 nucléotides hautement conservée appelée région X [81, 82], repliées en 3 tiges boucles successives.



**Figure 5. Organisation génomique du VHC et fonctions des protéines virales.** La traduction du génome du VHC produit une polyprotéine de 3010 aa qui est clivée par les protéases cellulaires (signal peptide peptidase, flèche rouge, et signal peptidase, flèches vertes) pour libérer les protéines structurales, la jonction NS2/NS3 est clivée par l'activité protéase à cystéine de NS2 (flèche orange) et les autres protéines non structurales sont maturées par la protéase à sérine NS3/4A. Les fonctions des protéines sont précisées. La protéine ARFP est issue d'un cadre de lecture chevauchant la séquence de la protéine core, sa fonction est inconnue.

## **INTRODUCTION**

### ***3) Expression et fonction des protéines virales***

Après l'entrée du virion dans la cellule, le génome viral est reconnu comme un ARN messager et traduit par la machinerie cellulaire de l'hôte pour former une poly-protéine précurseur d'environ 3 000 acides aminés (AA) [83]. La poly-protéine subit l'action d'enzymes cellulaires et virales au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique (RE) pour donner naissance à une dizaine de protéines ; les protéines structurales : Capside (C), 2 protéines d'enveloppe (E1 et E2), la protéine P7 et les protéines non structurales NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B. (**Figure 5**). Plus récemment, des anticorps contre une 11ème protéine, appelée protéine F, codée par un décalage du cadre de lecture de la région codant pour la capsid ont été détectés chez certains patients chroniquement infectés par le VHC ont été détecté. Cette protéine n'a pas de fonction connue et ne peut donc pas être classée dans les protéines structurales ou non structurales.

#### ***a. La protéine de capsid ou protéine C***

Constituant la nucléocapsid virale. La protéine C mature du VHC se localise sur la membrane du réticulum endoplasmique et s'associe aux gouttelettes lipidiques en induisant une accumulation lipidique intracellulaire [84, 85, 86]. La protéine core (ou capsid) joue un rôle important dans le recrutement des protéines non structurales et des complexes de réplication au niveau des gouttelettes lipidiques, elle joue également un rôle essentiel dans l'assemblage et la libération des virus infectieux et intervient également au moment du désassemblage du virus lors de l'entrée dans la cellule [87, 88]. De plus il a été rapporté que la protéine core interagit directement avec la tubuline, ce qui renforcerait la polymérisation des microtubules, afin de promouvoir le transport et/ou l'assemblage des particules virales [89].

#### ***b. La protéine F (frameshift) ou ARF (alternative reading frame) ou core+1***

Cette protéine a une durée de vie très courte, environ 10 min [90]. La détection d'anticorps et de cellules T spécifiques de la protéine F chez des patients infectés par le VHC suggère qu'elle est exprimée pendant l'infection VHC *in vivo* [91]. Elle n'est pas essentielle à la réplication virale ou à la production de virus infectieux [92], mais pourrait agir comme un facteur de régulation [93].

## **INTRODUCTION**

### ***c. Les protéines d'enveloppe E1 et E2***

Les protéines d'enveloppe **E1** et **E2** sont les constituants principaux de l'enveloppe [94]. Elles participent à l'entrée cellulaire du VHC en se fixant aux récepteurs cellulaires et en induisant la fusion de l'enveloppe virale avec les membranes cellulaires de l'hôte [95]. La protéine E2 est la cible préférentielle de la réponse immunitaire. Trois régions hypervariables (HVR) ont été identifiées dans la séquence E2: la région HVR1, à la partie N-terminale est constituée de 27 AA, la région HVR2 constituée de 9 AA et plus récemment la région HVR3, comprise entre les régions HVR1 et HVR2, constituée de 35 AA [96]. Cette dernière est moins variable que les 2 autres. D'un point de vue conformationnel, la région HVR1 est très conservée ce qui est cohérent avec le rôle qu'elle joue en tant que cible de la réponse immune et dans l'attachement du virus à la cellule [97].

### ***d. La protéine P7***

**La protéine P7** est une petite protéine (63 acides aminés) associée aux membranes, issue d'un clivage incomplet de la protéine E2. Ces fonctions sont encore mal connues. Elle pourrait appartenir à la famille des viroporines, et jouer un rôle dans la perméabilité membranaire en formant un canal ionique, en particulier au niveau des membranes du réticulum endoplasmique [98, 99, 100]. Elle semble nécessaire à l'infection mais pas à la réplication de l'ARN. Elle est également essentielle à l'assemblage des particules virales et aussi à la libération des virions [101].

### ***e. La NS2-3 protéase***

La protéine NS2 est une protéine transmembranaire. Elle est composée d'un domaine N-terminal membranaire et d'un domaine C-terminal formant, avec la partie N-terminale de NS3, une protéase à cystéine [327] responsable du clivage autoprotéasique entre NS2 et NS3. Ce clivage est indispensable à l'infection *in vivo* [102] et à la réplication en culture cellulaire [328]. Il semble qu'en plus de son activité protéolytique, NS2 soit impliquée dans la morphogénèse du VHC [326], ainsi cette La protéine serait capable d'interagir avec la protéine p7 et modulerait les interactions des glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 avec les protéines NS3 et NS5A se trouvant dans les complexes de réplication à proximité des GL dans des zones où l'assemblage viral aurait lieu [66].



## **INTRODUCTION**

### ***f. Le complexe NS3-4***

**La NS3** est une protéine multifonctionnelle qui possède une activité sérine protéase et hélicase/NTPase. Le polypeptide NS4A fonctionne comme cofacteur de la sérine protéase. Le complexe sérine protéase NS3/4A permet le clivage des protéines non structurales qui se trouvent en aval de NS3. NS3 intervient dans de nombreuses interactions hôte-pathogène et est une cible majeure des nouveaux anti-viraux. L'hélicase NS3 participe à la séparation des ARN double brin ou au déroulement des structures secondaires. Récemment, NS3 a été impliquée dans les étapes précoces de la morphogénèse des virions. Elle intervient dans le recrutement de NS5A aux gouttelettes lipidiques et la formation de particules virales intracellulaire. Des mutations d'adaptation peuvent chez un virus qui a perdu cette capacité restaurer cette propriété [103].

### ***g. La protéine NS4B***

La NS4B est peu connue. Elle participe à l'association des membranes mais également à l'altération des membranes intracytoplasmiques pour former des complexes membranaires supportant la réplication virale appelés « complexes de réplication » [177]. Leur formation dépend de certains résidus situés sur la partie C-terminale de la protéine NS4B [104].

### ***h. La protéine NS5A***

La NS5A est une phosphoprotéine fixant les ARN [105, 106], modérément hydrophile qui existe sous deux formes distinctes, de poids moléculaires respectifs 56 et 58 KDa, qui diffèrent par leur degré de phosphorylation. Elle est localisée à proximité des membranes du RE où elle est associée aux autres protéines non structurales au sein du complexe de réplication. Elle peut jouer un rôle dans l'assemblage des particules virales via son domaine III [107]. La délétion de ce domaine a pour conséquence l'arrêt de la formation de virions infectieux. Le domaine III de NS5A est une des régions les plus variables du génome VHC. Elle possède en outre de nombreuses propriétés qui pourraient jouer un rôle dans la pathogénie de l'infection. NS5A a aussi été impliquée dans la régulation de la réponse interféron et interagirait avec de nombreuses voies de signalisation cellulaire [108].

### ***j. La protéine NS5B***

La NS5B est une protéine de 68 KDa qui contient des motifs conservés caractéristiques des ARN polymérase dépendante de l'ARN (RdRp) [109]. Elle joue le rôle de catalyseur au sein de la machinerie de réplication du VHC. La NS5B est une protéine phosphorylée, localisée à



## INTRODUCTION

proximité des membranes périnucléaires où elle est associée aux autres protéines non structurales et à divers facteurs cellulaires au sein du complexe de réplication. Les mécanismes intimes de la réplication virale restent cependant incomplètement élucidés, mais cette protéine semble capable d'initier la synthèse *de novo* d'ARN *in vitro* et *in vivo* [110].

### *4) Variabilité génétique du VHC*

La diversification permanente des populations virales conduit à leur compétition et à la sélection continuelle des variants viraux les mieux adaptés à leur environnement réplcatif. Ce phénomène est favorisé par **l'abondante production virale**, de l'ordre de  $10^{12}$  virions par jour en moyenne, au cours de l'infection humaine [111] et par le **taux élevé de mutations**, au cours de la réplication lié au manque de fidélité de l'ARN polymérase [112]. Le taux d'erreur de l'ARN polymérase ARN dépendante du VHC est en effet de l'ordre de  $10^{-4}$  à  $10^{-5}$  par nucléotide copié. Chaque nouvel ARN synthétisé contient donc en moyenne une substitution nucléotidique par rapport à sa séquence mère [112]. Ces erreurs ne sont pas corrigées par l'ARN polymérase virale car celle-ci est dénuée d'activité 3'-5' exonucléase correctrice (activité de *proofreading*). Les substitutions s'accumulent donc dans le génome au cours des cycles de réplication successifs. La majorité des séquences virales synthétisées au cours de la réplication sont défectives (c'est-à-dire qu'elles ne peuvent conduire à la production de virions infectieux), car la plupart des mutations survenant au hasard sont létales. Les mutations non létales sont quant à elles transmises à la descendance et s'accumulent au fil des générations. Elles peuvent conférer aux variants correspondants des avantages ou des désavantages sélectifs selon l'environnement au sein duquel le virus se réplique [112]. On parle alors de « *genetic bottleneck* », un phénomène bien connu chez les virus à ARN.

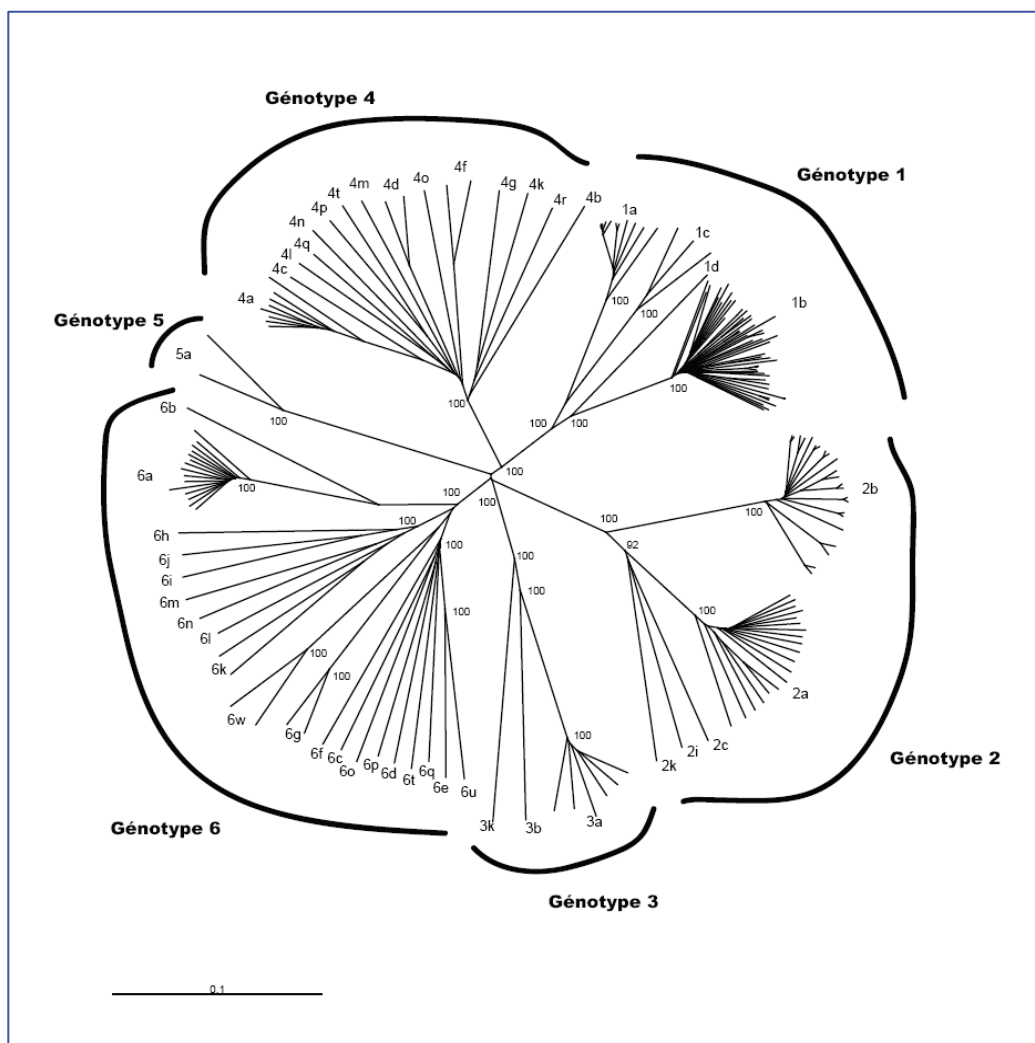
La production et la sélection permanente de nouveaux variants viraux ont trois conséquences importantes : l'émergence, dans des zones géographiques ou dans des populations de malades particulières, des **génotypes du VHC** et leur diversification intervenue au cours de l'évolution et qui se poursuit, l'existence d'une **distribution en quasi-espèces** de populations virales chez chaque individu infecté et au final des **implications cliniques**.

#### *a. Émergence et diversification des génotypes du VHC*

L'analyse phylogénétique de séquences partielles ou complètes de souches virales isolées dans les cinq continents a permis d'identifier 6 génotypes (1 à 6) et plusieurs sous-types. Les génotypes diffèrent entre eux de 30% à 35% au niveau de leur séquences nucléotidiques et

## INTRODUCTION

environ 30% au niveau de leur séquence amino-acidique [255]. Dans un même génotype on distingue différents sous-types désignés par un chiffre et une lettre minuscule (1a, 1b, 1c, etc.) présentant un taux de variation de 20% en moyenne, avec des différences importantes selon la région du génome considéré [113,255]. Chez un même individu infecté on retrouve également une grande hétérogénéité génétique se traduisant par l'existence de quasi-espèces [113]. Des niveaux de divergence intermédiaires entre génotype et sous-type ont été observés chez des variants viraux isolés principalement en Asie du Sud-Est. Ces derniers ont été initialement appelés génotypes 7 à 11 [114]. Ils sont aujourd'hui inclus dans le génotype qui leur est le plus proche (**Figure 6**) [113].

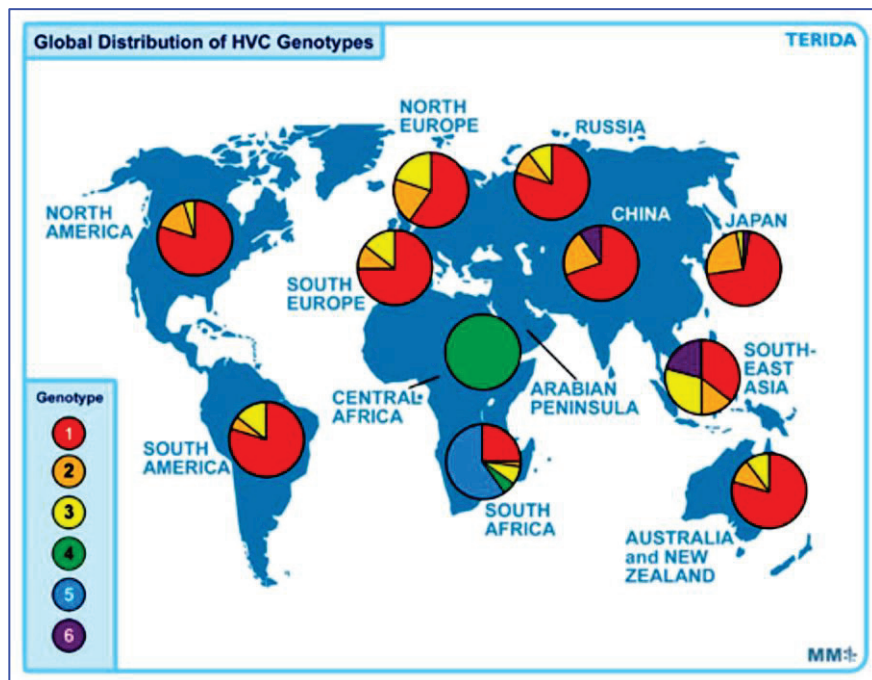


**Figure 6 : Analyse phylogénétique des souches virales VHC (Robertson, B., et al. 1998).**

## INTRODUCTION

L'étude génétique et phylogénétique des génotypes du VHC permet de mieux comprendre les mécanismes ayant conduit à leur émergence et à leur diversification, ainsi que les voies empruntées par l'épidémie mondiale d'hépatite C [113]. Ainsi, l'origine des *flaviviridae* infectant les primates pourrait remonter à la diversification des espèces de primates il y a environ 35 millions d'années. Le VHC aurait alors co-évolué avec les populations humaines lors de leur migration hors d'Afrique, il y a 100 000 à 150 000 années. Les génotypes actuels seraient apparu beaucoup plus récemment [115], il y a 700 ans pour le génotype 6, 350 ans pour le génotype 4 et 100 ans pour les autres [116].

Les différents génotypes du VHC ont une distribution géographique mondiale variable (**Figure 7**) [334]. Les génotypes 1,2 et 3 sont répartis à l'échelle mondiale. Le génotype 4 caractérise la zone du Proche-Orient, le génotype 5 prévaut en Afrique du Sud, le génotype 6 est plus spécifique de l'Asie, particulièrement l'Asie du Sud-Est. La grande diversité des génotypes en Asie ou en Afrique suggère une apparition très ancienne de ceux-ci. A l'opposé, la diversification des génotypes retrouvés en Europe, en Amérique ou au Japon est bien plus faible, suggérant une apparition récente suivie d'une diffusion rapide. Schématiquement, le génotype 1b a été diffusé par les produits sanguins, le 1a par la toxicomanie par voie intraveineuse et le 3 par cette même voie mais seulement à partir des années 1960 [117]. Cela se confirme par exemple avec le ralentissement de la propagation du génotype 1b à relier avec la quasi disparition du risque transfusionnel.



**Figure 7: Distribution mondiale des génotypes VHC (Zein et al. 2000)**

## **INTRODUCTION**

### ***b. Distribution en quasi-espèces des génomes du VHC***

Chez tout malade infecté, le VHC circule sous la forme d'un mélange complexe et en équilibre instable de variants viraux génétiquement distincts bien qu'apparentés, appelé quasi-espèce [118, 119]. La distribution en quasi-espèces du VHC lui confère un avantage significatif en terme de survie, car la coexistence de multiples variants génomiques et la rapidité avec laquelle de nouveaux variants sont engendrés permettent la sélection rapide et continue des variants viraux les mieux adaptés à l'environnement réplicatif [112].

Les forces sélectives antagonistes assurant cette sélection sont :

- » les **contraintes conservatoires** sur la structure de l'ARN et/ou des protéines virales, liées à la nécessité de conserver leur fonctionnalité, indispensable à la survie des virions.
- » des **pressions évolutives**, principalement liées aux réponses immunes humorales et cellulaires de l'hôte [120].

Les modifications de l'environnement dans lequel le VHC se réplique sont fréquentes au cours de l'infection. Elles peuvent être spontanées, liées à des interactions métaboliques complexes chez l'hôte ou déclenchées par des facteurs extérieurs, tels que des infections intercurrentes, une prise médicamenteuse ou un traitement antiviral.

### ***c. Implication cliniques***

Au niveau clinique, cette distribution en génotypes du VHC a des conséquences variables. Au niveau du **pronostic de l'évolution** vers la chronicité ou des lésions hépatiques, le génotype n'a pas d'impact. Seul le génotype 3 est directement impliqué dans l'apparition de stéatose hépatocytaire [121]. La **réponse virologique** aux traitements (c'est-à-dire la capacité du traitement à éradiquer l'infection) est par contre très dépendante du génotype, mais en résumé il est admis que les taux de réponses sont plus faibles pour les génotypes 1 et 4 que pour les génotypes 2 et 3 [122]. Enfin cette variabilité pose des problèmes pour le **développement d'un vaccin**, thérapeutique ou prophylactiques. En effet les épitopes potentiellement neutralisants sont aussi les régions les plus variables du génome.

## **INTRODUCTION**

### ***III. Les principaux systèmes d'étude du virus de l'hépatite C***

Bien que le clonage du VHC ait permis une analyse rapide de son organisation génomique, ainsi qu'une caractérisation biochimique de ses protéines, l'absence de système de culture cellulaire permettant son amplification efficace a constitué pendant plus de quinze ans un obstacle majeur dans l'étude du cycle infectieux de ce virus. Une grande partie des études initiales visant à définir les propriétés physiques et la pathogenèse du VHC ont été réalisées sur des échantillons cliniques et par l'infection expérimentale de chimpanzés par du virus isolé de sera de patients. Par la suite, différents modèles ont été développés *in vitro* et *in vivo* afin d'étudier les différentes étapes du cycle infectieux, de caractériser les interactions du virus avec l'hôte ou d'évaluer l'activité antivirale de molécules. Ces approches se sont avérées très utiles, en particulier les modèles des réplicons et des particules rétrovirales pseudotypées avec les protéines d'enveloppe du VHC (VHCpp) ont constitué deux avancées majeures avant la mise au point, en 2005, du système de culture cellulaire du VHC (VHCcc).

#### ***A. Les modèles animaux***

##### ***1) Le chimpanzé***

Le VHC est un virus qui, dans la nature, infecte uniquement les humains. Jusqu'à présent, les scientifiques n'ont jamais détecté d'autre animal infecté par ce virus de manière naturelle. Expérimentalement, le chimpanzé est le seul animal pouvant être infecté de façon stable et reproductible par le VHC. Cette infection induit des signes cliniques et une progression de la maladie similaires à ce que l'on observe chez l'homme, notamment l'établissement d'une virémie persistante et le développement de réponses immunitaires innée et adaptative spécifiques. Cependant, chez le chimpanzé, les réponses immunitaires semblent atténuées et la sévérité de la maladie est souvent moins importante que chez l'homme. L'utilisation du chimpanzé reste tout de même limitée pour des raisons éthiques mais également du fait de sa rareté et du coût de son entretien.

##### ***2) Souris chimériques***

Il s'agit de souris transgéniques pour un ou plusieurs gènes du VHC. Les principales études se sont focalisées sur l'expression de la protéine de capside afin d'étudier son effet sur le métabolisme de l'hôte. Il a ainsi pu être montré qu'elle était responsable de lésions de l'ADN mitochondrial, reflétant ainsi l'augmentation de radicaux libres, ce qui pourrait expliquer les lésions de l'ADN des hépatocytes et à terme le développement du CHC [123]. Ce modèle

## **INTRODUCTION**

reste cependant limité car aucune souris transgénique n'a été capable de répliquer le génome viral.

### ***3) Souris humanisées***

D'autres modèles animaux plus abordables ont été recherchés, ceci a notamment conduit au développement d'un modèle de souris xénogreffées (« humanisées »). Il s'agit de souris immunodéprimées (SCID20), dont le foie a été détruit par l'expression d'un transgène activateur de plasminogène (Alb-uPA21) puis recolonisé par des cellules hépatiques humaines. L'infection de ces souris par des sera de patients chroniquement infectés par le VHC permet d'établir une infection persistante et la production de particules virales infectieuses. Ce modèle est notamment très utile pour étudier l'activité antivirale de molécules ou l'activité neutralisante d'anticorps [124]. Malheureusement, ce modèle animal est très lourd à mettre en place.

### ***B. Les modèles cellulaires***

Les premières tentatives de mise au point d'un système cellulaire d'étude du VHC ont consisté en la culture de cellules hépatocytaires provenant de patients chroniquement infectés par le VHC. Ainsi, des équipes ont montré la réplication et la production de VHC dans des hépatocytes primaires isolés de patients chroniquement infectés [125]. Plusieurs groupes ont également décrit l'utilisation de cultures d'hépatocytes primaires humains ou de chimpanzé et montré leur infectabilité par le VHC [126, 127, 128]. Ces modèles ont l'avantage de refléter du mieux possible les conditions d'une infection *in vivo*. Toutefois, dans tous ces essais, la réplication et la propagation virales étaient très faibles. De plus, ces systèmes sont peu reproductibles. D'autres essais de culture de cellules mononuclées du sang (CMS) provenant de patients chroniquement infectés [129] ou d'infection de CMS naïves avec des sera de patients infectés [130] ont été réalisés. Ils ont permis de confirmer que le VHC se réplique dans ces cellules mais les taux de production virale étaient trop faibles pour que ce modèle serve à l'étude du cycle viral. D'autre part, les cultures de cellules primaires présentent des contraintes techniques et logistiques non négligeables. Pour contourner ces inconvénients, des essais de propagation du VHC ont donc été menés avec différentes lignées cellulaires. Ces études ont notamment permis de montrer que les lignées hépatocytaires PH5CH et Huh-7 et les lignées lymphocytaires T (MOLT-4 et MT-2) et B (Daudi) sont sensibles et permissives à l'infection par le VHC [131, 132, 133].

## **INTRODUCTION**

### ***1) Les réplicons subgénomiques et génomique***

L'étude de la réplication virale VHC est rendu possible grace au développement des réplicons subgénomique [134]. Les réplicons sont des ARN réplicatifs autonomes bicistronique contenant en 5' l'IRES du VHC permettant la traduction d'un gène de résistance à un antibiotique (néomycine), l'IRES du virus de l'encéphalomyocardite(VEMC) assurant la traduction des protéines structurales du VHC (de NS3à NS5B), le tout est encadré par les régions 5' et 3' NTR du VHC, ces constructions, une fois transcrites en ARN sont transfectées dans des cellules Huh7 permmettent, par sélection à la néomycine, d'isoler des clones cellulaires capables de répliquer de manière autonome le génome viral (**Figure 8**).

Cette approche a permis la sélection de lignées cellulaires répliquant fortement le virus. Une de ces lignées cellulaires, appelée Huh7.5, a été obtenue par traitement à l'IFN- $\alpha$ , des cellules répliquant très efficacement le réplicon. une fois guéries, elles ont été re-transfectées par l'ARN viral et elle présentaient une forte capacité à répliquer le virus que les autres lignéess [136]. Depuis, il a été montré que les Huh7.5 porte une mutation dans le gène codant le récepteur intra-cytoplasmique d'ADN double brin, RIG-1 impliqué dans l'activation de l'immunité innée, pouvant expliquer l'augmentation de réplication de l'ARN VHC dans ces cellules [135]. La culture cellulaire de ces réplicons subgénomiques conduit à l'apparition de mutations adaptatives qui augmentent significativement le taux de réplication dans les cellules transfectées [136, 137].

Bien que les réplicon génomiques contiennent la séquence complète du VHC, et se répliquent efficacement en culture cellulaire sous pression de sélection antibiotique, ne permettent toutefois pas la production de particules virales infectieuses [138].

le réplicon reste un outil de choix pour l'étude de la réplication de l'ARN viral et certaines interactions virus-hôte, ainsi que pour la validation de nouvelles drogues antivirales.

## INTRODUCTION

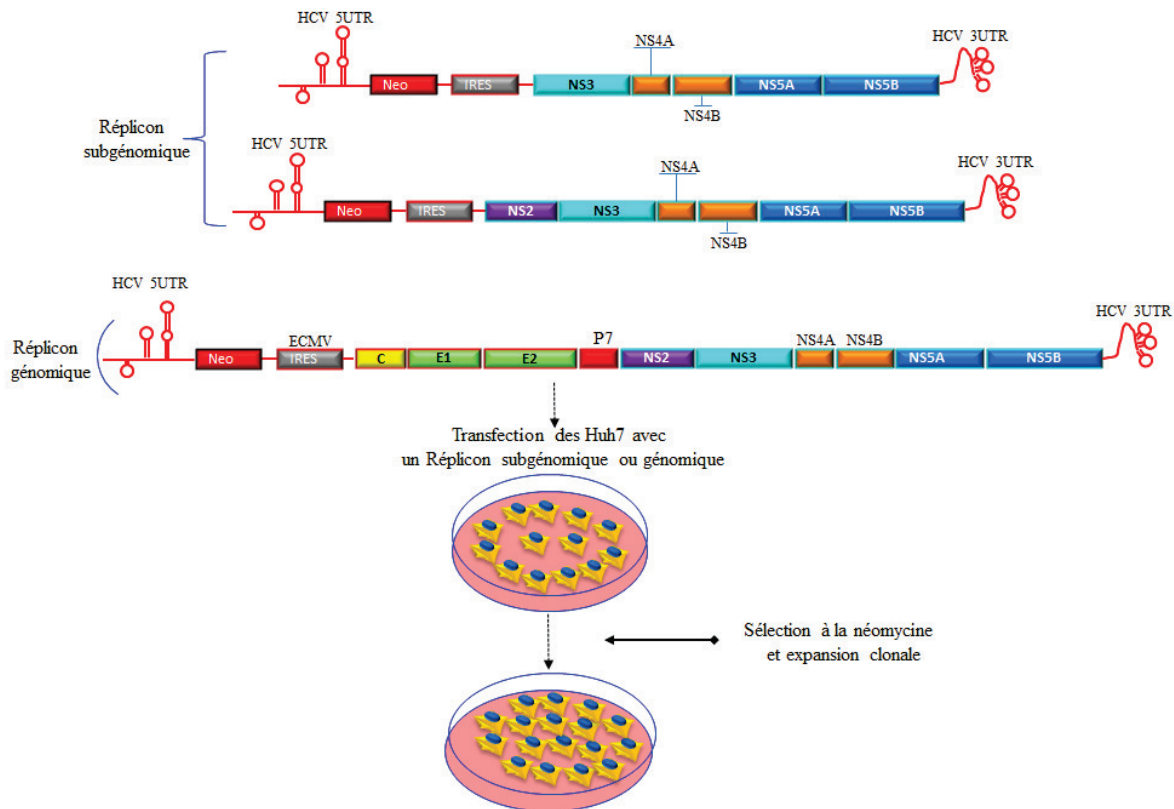


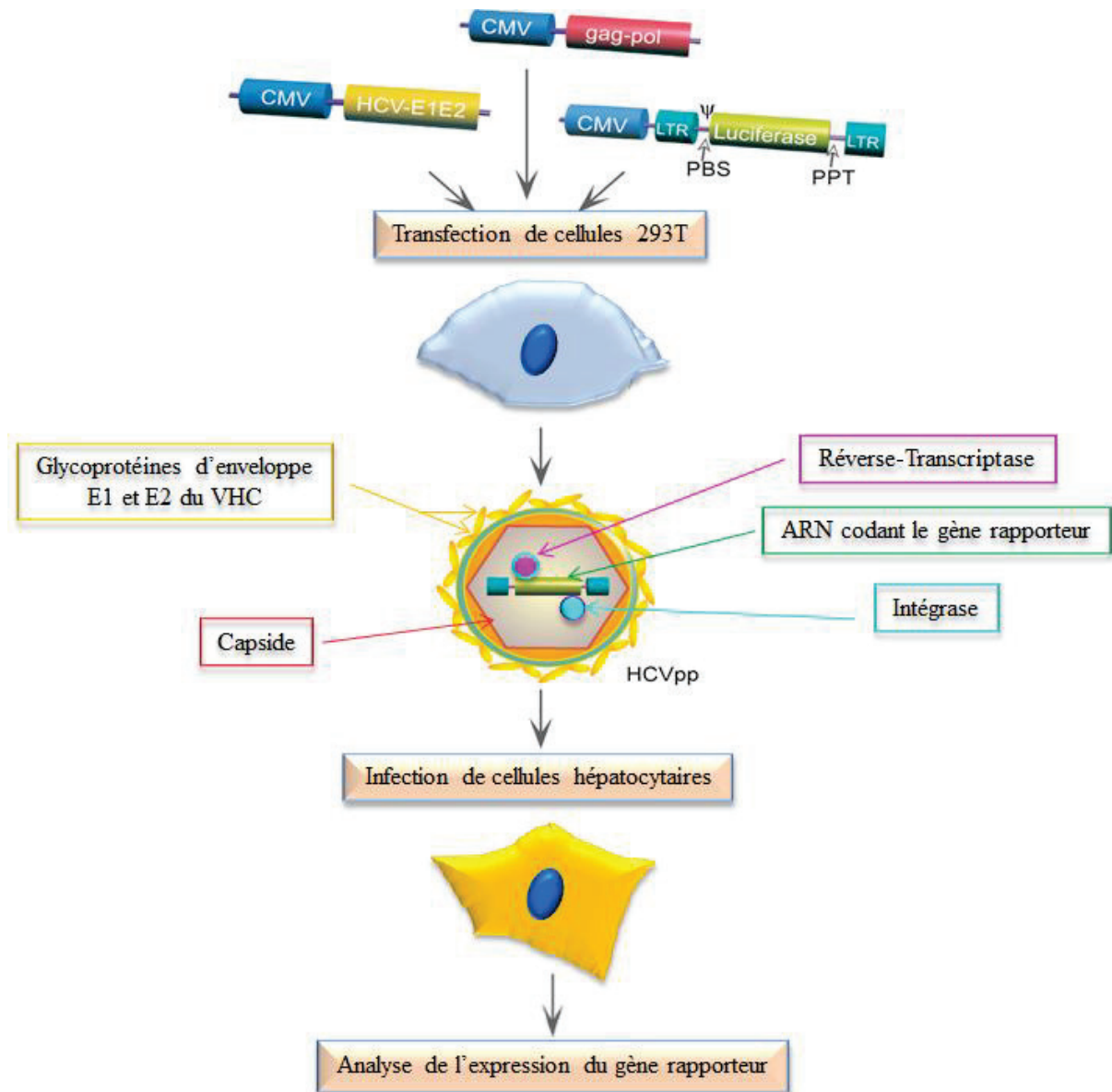
Figure 8 : représentation schématique du système répliqueur VHC

### 2) Les pseudoparticules VHC

Les pseudo-particules du VHC (VHCpp), sont des virus chimériques constitués des glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 du VHC, d'une capside du virus de la leucémie murine (MLV) ou du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) ainsi que d'un gène rapporteur codant la luciférase ou la GFP [139, 140]. Les VHCpp sont obtenues par co-transfection de trois vecteurs codant pour les trois composants décrits précédemment. Les VHCpp formées dans les cellules 293T sont sécrétées dans le milieu de culture et le surnageant est utilisé pour infecter des cellules hépatocytaires [139] (**Figure 9**). L'infection des cellules cibles est quantifiée par la mesure de l'expression du gène rapporteur dans les cellules infectées. L'entrée de ces particules est neutralisée par des anticorps dirigés contre la glycoprotéine d'enveloppe E2 et par des sérums de patients infectés [141]. Toutefois Ce modèle se limite à l'étude de l'entrée du virus dans la cellule cible.



## INTRODUCTION



**Figure 9: Production de pseudo-particules VHCpp.** Les cellules 293T sont transfectées avec trois vecteurs d'expression. Le premier code les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 du VHC. Le second exprime les protéines codées par les gènes gag et pol du MLV ou du VIH (Matrice, Capside, Nucléocapside, Protéase, Réverse-transcriptase et Intégrase). Le troisième exprime un génome rétroviral contenant un gène rapporteur. Le génome rétroviral contient les séquences nécessaires à la réverse transcription et à l'intégration de l'ADN proviral dans l'ADN génomique de la cellule infectée (LTR, PBS, PPT). Les protéines de matrice, capsid et nucléocapside permettent son encapsidation (grâce au signal d'encapsidation  $\psi$ ), l'assemblage de la particule et son bourgeonnement à la membrane plasmique. Les particules rétrovirales VHCpp, portant à leur surface les glycoprotéines E1 et E2, sont sécrétées dans le surnageant de culture. Elles sont utilisées pour infecter des cellules hépatocytaires. Les cellules infectées intègrent le gène rapporteur dans leur ADN génomique grâce aux reverse-transcriptase et intégrase. L'expression de ce gène rapporteur permet de quantifier l'infectiosité des VHCpp.

## **INTRODUCTION**

### ***3) Les particules du VHC produites en cultures cellulaires***

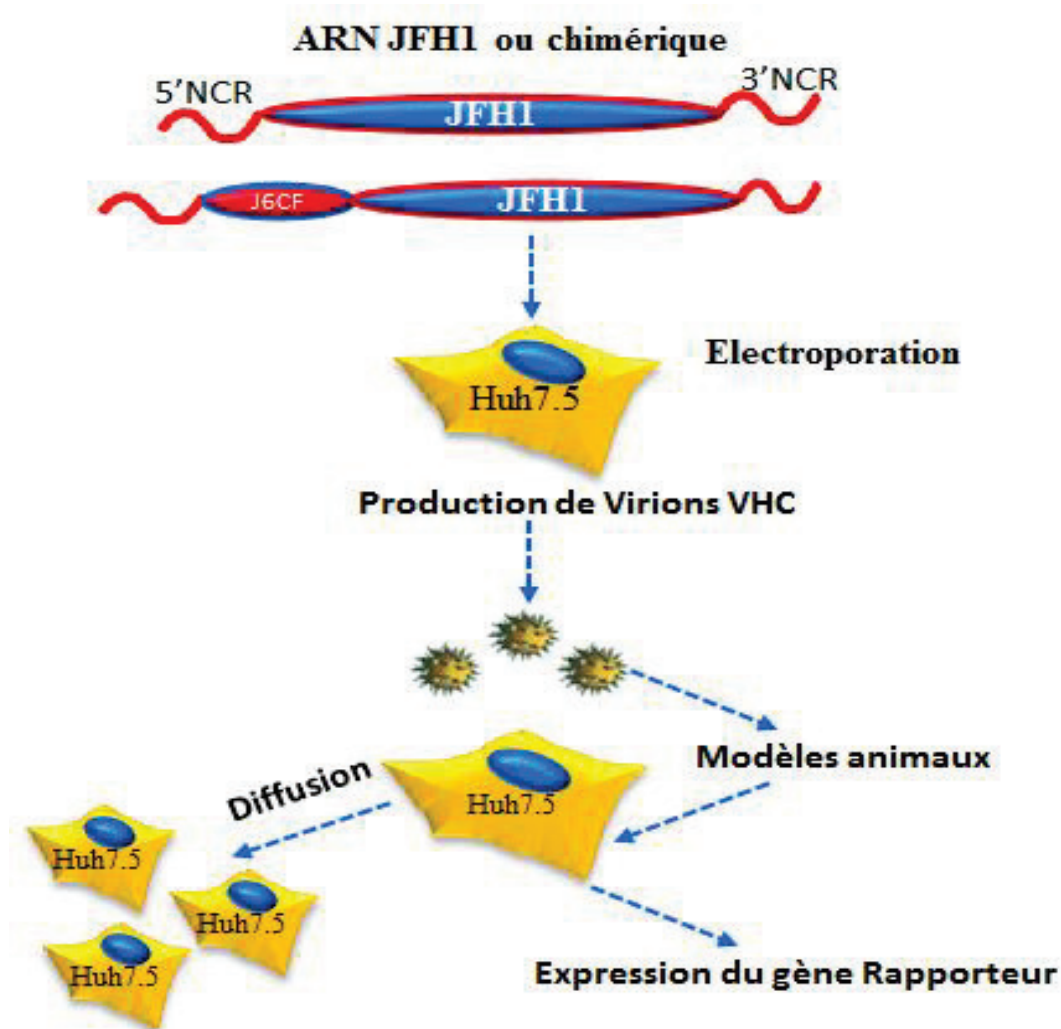
#### ***(JFH1 culture cellulaire)***

Récemment, un variant du génotype 2a, dénommé JFH-1, a été décrit comme pouvant se répliquer en culture cellulaire sans nécessiter de mutations adaptatives et produire des particules virales infectieuses [142]. Ce clone moléculaire a été généré à partir d'une séquence consensus isolée chez un patient japonais atteint d'une hépatite fulminante [143]. Ce nouveau système, appelé VHCcc pour VHC produit en culture de cellules, est basé sur la transfection de l'ARN génomique complet du clone moléculaire JFH-1 obtenu par transcription *in vitro*, dans la lignée d'hépatocarcinome humain Huh-7 (**Figure 10**). Cependant, le VHCcc se propage mieux dans les sous-clones de cellules Huh-7 (Huh7.5, Huh7.5.1 ou Huh-7-Lunet) qui ont été sélectionnés pour la réplication du réplicon sous-génomique du VHC puis traités par l'interféron alpha afin d'éliminer ce réplicon. Ce système permet de produire de manière relativement efficace du virus natif capable de réinfecter des cellules naïves. Ces virus permettent également une infection productive chez le chimpanzé et chez des souris transplantées avec des hépatocytes humains [143]. Des génomes chimériques dérivés de JFH-1 ont également été développés. La partie N-terminale de la polyprotéine du VHC (de la protéine Core au premier segment transmembranaire de NS2) a été remplacée par la région analogue d'autres génotypes du VHC, les souches H77 (génotype 1a), con1 (1b), J6CF (2a) et 452 (3a) [144]. De façon intéressante, malgré un niveau comparable de réplication, les cellules transfectées par ces différents génomes recombinants libèrent des taux très variables de particules infectieuses. La construction la plus efficace à ce jour est la chimère JC1/JFH-1 composée des protéines core jusqu'au premier segment de NS2 de la souche J6CF. Afin d'améliorer la sensibilité de détection des cellules infectées, des génomes viraux bicistroniques exprimant un gène rapporteur (la Luciférase ou la GFP) ont été développés [145, 146].

Le développement de ce modèle d'étude du VHC en culture cellulaire rend désormais possible l'étude du cycle viral complet du VHC. En effet, ce système a permis de confirmer les travaux antérieurs obtenus avec d'autres systèmes, comme le rôle des glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 dans l'entrée virale [147], le tropisme préférentiel pour les cellules hépatiques [142] et le rôle des récepteurs impliqués dans l'entrée du VHC [145, 148].

## INTRODUCTION

Ce modèle VHCcc a également permis, ces dernières années, de progresser dans l'étude d'autres étapes du cycle viral, qui n'ont pas pu encore être explorées, telles que l'assemblage et la sécrétion des particules virales infectieuses.



*Figure 10 : représentation schématique du système VHCcc*

### *IV. Cycle de vie du VHC*

Un schéma général des différentes étapes du cycle infectieux du VHC a pu être établi (**Figure 11**), par analogie avec des virus phylogénétiquement proches, mais également grâce à l'utilisation des différents modèles décrits précédemment, l'infection débute par l'attachement du virus à la surface des cellules, via différents facteurs d'entrée. Le virus est ensuite internalisé par une voie d'endocytose dépendante de la clathrine. La fusion de l'enveloppe virale avec la membrane endosomale conduit à la libération de l'ARN viral dans le

## INTRODUCTION

cytoplasme. Cet ARN génomique est traduit en une polyprotéine, dont les clivages co- et post-traductionnels vont permettre la formation des protéines virales. Les protéines non-structurales permettent la réplique de l'ARN viral. De nouveaux virions, composés des protéines structurales et de l'ARN génomique, s'assemblent et sont sécrétés par la suite dans le milieu extracellulaire.

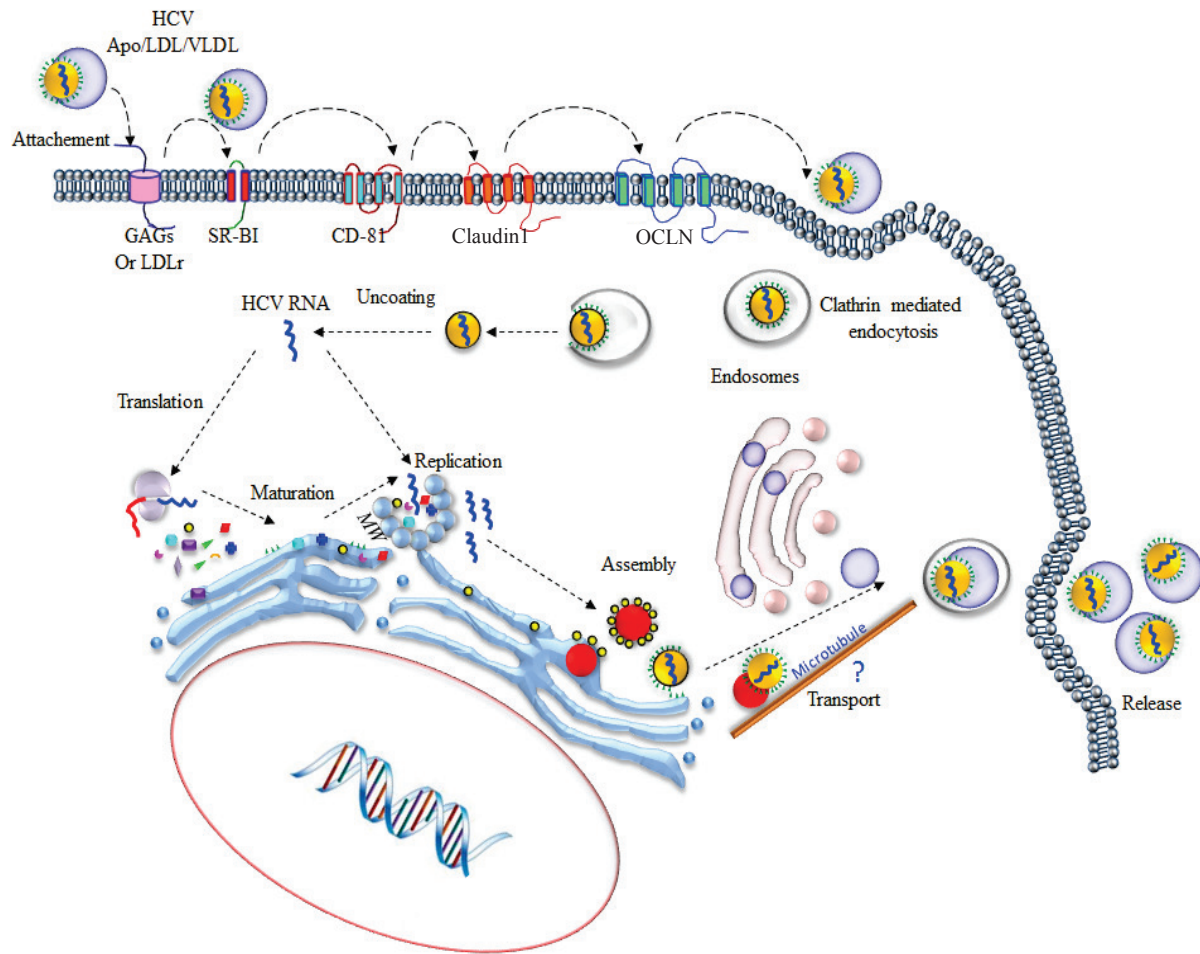


Figure 11: Cycle de vie du VHC.

## **INTRODUCTION**

### ***A. Les voies d'entrée, d'internalisation de la particule virale et de fusion avec la membrane endosomale***

L'attachement du virus à la cellule hôte puis son entrée dans cette cellule fait intervenir une cascade d'événement mettant en jeu le virus, via les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2, et de nombreux facteurs et cofacteurs cellulaire (**Figure 11**). Une grande fraction des particules virales sont présentes dans le milieu extérieur sous forme de LVPs (lipo-viro-particules) [149]. La formation de ces complexes VHC lipoprotéines est proposée comme un facteur favorisant la liaison et la concentration du virus sur la cellule. Dans un premier temps les glycosaminoglycanes (GAGs) et le récepteur aux LDL (LDL-R) [150] présents à la surface de la cellule vont amorcer le processus d'ancrage des VLPs via les lipoprotéines, puis les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 vont reconnaître les cofacteurs cellulaires spécifiques du VHC qui sont la tétraspanine CD81 [151], le scavenger récepteur B-I (SR-BI) [152]. Cependant, ces deux récepteurs ne sont pas suffisants pour autoriser l'entrée du virus et d'autres récepteurs ont été recherchés. Les Claudines 1, 6 et 9, protéines des jonctions serrées, largement exprimées par les hépatocytes, sont de nouvelles protéines de la famille des Claudines impliquées dans l'entrée du VHC [153]. Les Occludines, également composant des jonctions serrées, ont été dernièrement impliquées dans l'entrée de ce virus [154]. Elles interagissent avec la glycoprotéine E2 et rendent les cellules murines infectables par HCVpp [336].

D'autres molécules semblent toutefois nécessaires aux processus d'entrée du VHC. Récemment, il a été identifié une molécule partenaire du CD81, EWI-2wint, qui inhibe l'entrée du VHC. Cette molécule est absente des hépatocytes et suggère que l'entrée du VHC nécessite des facteurs favorisant l'entrée mais également l'absence d'inhibiteur, leur combinaison déterminant le tropisme du virus [155]. De plus, les lectine DC-SIGN (Dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin) et L-SIGN (Liver/Lymph node specific intracellular adhesion molecule-3-grabbing non integrin) ont également la capacité d'interagir avec la glycoprotéine d'enveloppe E2 et constitue donc des récepteurs potentiels du VHC. L-SIGN est exprimée sur les cellules épithéliales des sinusoides du foie, tandis que le DC-SIGN est présent sur les macrophages, les cellules dendritiques et les lymphocytes T. Ceci suggère que la fixation à ces récepteurs contribue *in vivo* à la capture et à la transmission du HCV dans les cellules hépatiques ou à la possibilité d'une persistance virale dans les cellules mononuclées [156, 157].

## **INTRODUCTION**

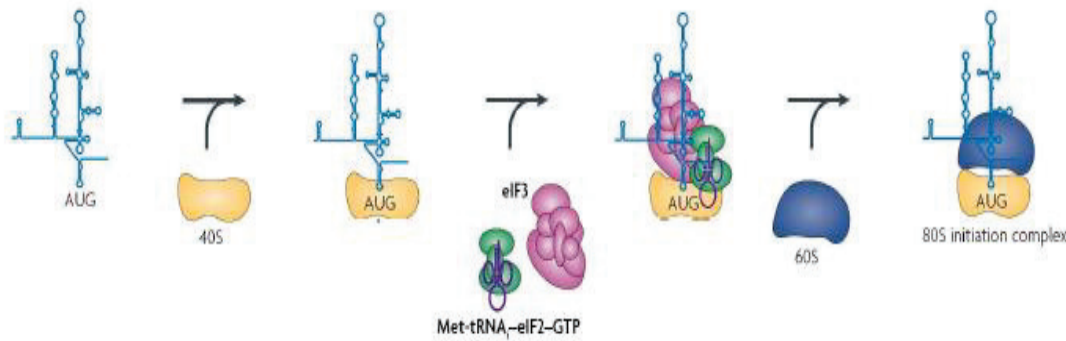
L'internalisation des virus enveloppés dans la cellule hôte peut se faire de deux manières. La première est une fusion entre l'enveloppe du virus et la membrane cellulaire. La seconde est l'endocytose de la particule virale puis la fusion de l'enveloppe avec la membrane de l'endosome. Dans le cas du VHC, il a été montré que la particule virale est endocytée via les puits à clathrines [154] et ce n'est que dans les endosomes précoces, sous l'effet du pH acide [154, 158, 159, 160], que les membranes fusionnent pour libérer le génome viral dans le cytosol [157].

### ***B. La Traduction de la polyprotéine virale***

Une fois libéré dans le cytoplasme, Le génome viral de polarité positif est pris en charge par la machinerie traductionnelle cellulaire et est traduit en une polyprotéine précurseur virale unique d'environ 3010 aminoacides (**Figure 4**). Contrairement aux ARNm cellulaires dont la traduction est coiffe-dépendante, les molécules d'ARN viral naturellement dépourvues de coiffe comme celles des flavivirus sont traduites par un processus médié par l'IRES [74]. Les analyses structurales indiquent que l'IRES du VHC est organisé en une structure secondaire, complexe et hautement conservée comprenant quatre domaines distincts (I-IV). Cette organisation permet sa liaison au complexe d'initiation de la traduction avec une forte affinité [161]. La sous-unité 40S du ribosome se fixe sur le domaine III. Ce complexe permet de recruter, au niveau de l'AUG initiateur, le facteur d'initiation eucaryote eIF3 et le complexe ternaire Met-ARNt-eIF2-GTP formant ainsi un intermédiaire non canonique 48S [162]. L'étape suivante est l'association, de manière GTP dépendante, de la sous-unité 60S pour former un complexe 80S (**Figure 12**) [77]. Différentes protéines cellulaires comme la polypyrimidine tract-binding protéin (PTB), ou la protéine hnRNP I (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein I) sont capables d'interagir spécifiquement avec l'IRES du VHC et pourraient jouer un rôle dans l'initiation de la traduction [163, 164, 165]. La régulation de la traduction de l'ARN viral implique également des facteurs viraux, l'expression de core inhibe la traduction du VHC du fait de sa liaison à un triplet de GGG dans la tige-boucle IIIId [166]. Ce qui suggère une régulation par une liaison compétitive de l'IRES par core et la sous-unité 40S du ribosome [166]. Une autre étude pointe plutôt un effet régulateur non de la protéine core elle-même mais plutôt de sa séquence codante par une interaction ARN-ARN [167]. Il a été rapporté que les protéines non structurales : NS4A, NS4B et NS5A peuvent aussi inhibent l'activité de l'IRES [168].



## INTRODUCTION



**Figure 12 : Modèle de formation du complexe d'initiation de la traduction médiée par l'IRES du VHC (Fraser CS, Doudna JA (2007))**

### ***C. La Maturation de la polyprotéine***

La polyprotéine issue de la traduction du génome du VHC va ensuite subir des clivages protéolytiques co- et post-traductionnels par des protéases virales et cellulaires au niveau du réticulum endoplasmique, libérant les protéines structurales et non-structurales. Les clivages aux jonctions core-E1, E1-E2, E2-p7, p7-NS2 sont réalisés par des signal-peptidases cellulaires localisées dans le RE, libérant des protéines matures [169]. Un clivage supplémentaire par une peptidase à peptide signal au niveau de l'extrémité C-terminale de Core le sépare de E1 et le libère de la membrane du RE [170]. La maturation des protéines non structurales est réalisée par deux protéases virales: Le clivage entre NS2 et NS3 est une réaction intramoléculaire rapide médiée par la protéase NS2-3 qui sépare NS2 de la partie N-terminale de NS3. Les jonctions restantes sont traitées par une sérine protéase localisée dans les 180 résidus N-terminaux de la protéine NS3. La région NS3-NS5B est maturée par un clivage séquentiel: NS3/4A, NS5A/5B, NS4A/5A [171]. Le clivage de NS3/4A est intramoléculaire alors qu'il est intermoléculaire pour toutes les autres.

### ***D. La Réplication virale***

La maturation de la polyprotéine virale conduit à la libération des protéines structurales et non structurales permettant ainsi d'initier la réplication. Le mécanisme de la réplication est encore largement méconnu, cependant un modèle a pu être établi proposant que la réplication du HCV est assurée par un complexe de réplication (CR) dans lequel sont associées les protéines non structurales NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B, l'ARN viral et des facteurs cellulaires. Celui-ci est associé aux structures membranaires et vésiculaires périnucléaires formant une

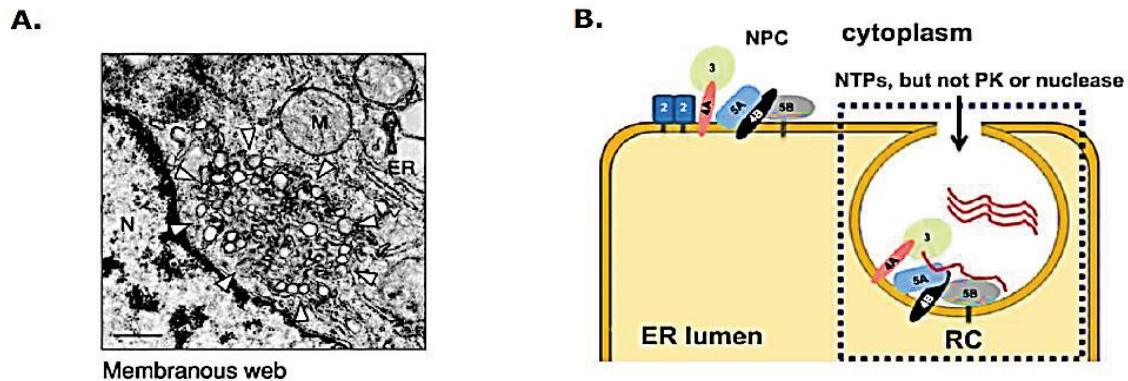
## **INTRODUCTION**

palte forme pour la réplication virale : le « membranous web » [175, 176] (**Figure 13**) [175,335]. La composition précise du complexe de réplication n'est pas connue. Dans les cellules possédant le réplicon, seule une petite portion de protéines non structurales est associée au CR, alors que la majorité ne l'est pas, ce deuxième complexe est appelé complexe des protéines non-structurales [172,173]. Au regard de ces résultats, les auteurs suggèrent qu'un CR actif est composé, d'ARN (-), d'ARNs (+) et de plusieurs centaines de protéines non structurales, pouvant être des éléments structuraux à la formation de compartiments vésiculaires qui sont les sites de la réplication du VHC (**Figure 13**) [175,335]. Le rôle de cette compartimentalisation n'est pas encore bien compris. Cela peut inclure un rôle de support physique, de concentration des protéines virales, afin de les rendre plus accessibles à l'amarrage à l'ARN viral et un rôle important pour la protection de l'ARN viral contre les défenses cellulaires [174]. Cet environnement favoriserait, donc les interactions entre les différents partenaires intervenant dans l'initiation de la réplication. La protéine NS4B serait en partie impliquée dans ces remaniements membranaires [177, 178]. La protéine NS5A *via* ses propriétés de liaison à l'ARN, pourrait ainsi recruter l'ARN viral. L'ARN polymérase NS5B reconnaît ensuite la région X-tail de l'extrémité 3'UTR de la matrice ARN de polarité positive [181], et initie ainsi la synthèse du brin complémentaire négatif. La protéine NS3 serait alors capable de séparer les deux brins d'ARN *via* son activité hélicase/ NTPase [182]. La protéine NS4A permettrait l'ancrage membranaire de NS3 et servirait de cofacteur à NS3 [183]. Le brin néosynthétisé servirait ensuite de matrice pour la synthèse de nombreux brins d'ARN de polarité positive, qui seront encapsidés et enveloppés pour devenir les génomes des particules virales néoformées ou serviront de nouveaux messagers pour la synthèse des protéines virales. D'autres interactions des protéines virales avec des facteurs cellulaires et notamment le cytosquelette ont été décrites et semblent nécessaires à la réplication virale [256, 257]. Ainsi les protéines associées aux membranes, VAP-A et VAP-B, localisées au niveau du RE et de l'appareil de Golgi, sont impliquées dans la formation d'un CR fonctionnel [178, 179], et peuvent moduler la réplication de l'ARN VHC *via* leur interaction avec la NS5A. De plus, les protéines NS3 et NS5A interagissent avec les filaments d'actine et les microtubules ce qui favoriserait la mobilité des complexes de réplication [174]. Ces derniers résultats restent cependant à confirmer. Un lien entre le cycle du VHC et le métabolisme lipidique a été démontré depuis plusieurs années. In vitro, la réplication de l'ARN du VHC peut être stimulée par des acides gras saturés et mono-insaturés, et inhibée par des acides gras poly-insaturés ou par inhibition de la synthèse des acides gras. Ces



## INTRODUCTION

résultats soulignent l'importance de la fluidité des membranes pour la formation du réseau membranaire et pour le bon fonctionnement du complexe de réplication [184].



**Figure 13: (A) Réseau membranaire siège de la réplication du VHC et (B) modèle de formation du CR du VHC (Gosert et al., 2003 (ME) ; Tang and Grise, 2009).** A ; le «membranous web de cellules Huh7 répliquant un réplicon subgénomique du VHC vu par microscopie électronique. Baree =500nm ; N : Noyau ; ER : Réticulum Endoplasmique ; M : Mitochondrie. B modèle de formation du complexe de réplication (CR) localisé dans les invaginations de la membrane du RE, protégés des protéinases K (PK) et des nucléases. NPC : complexe de protéines non-structurales.

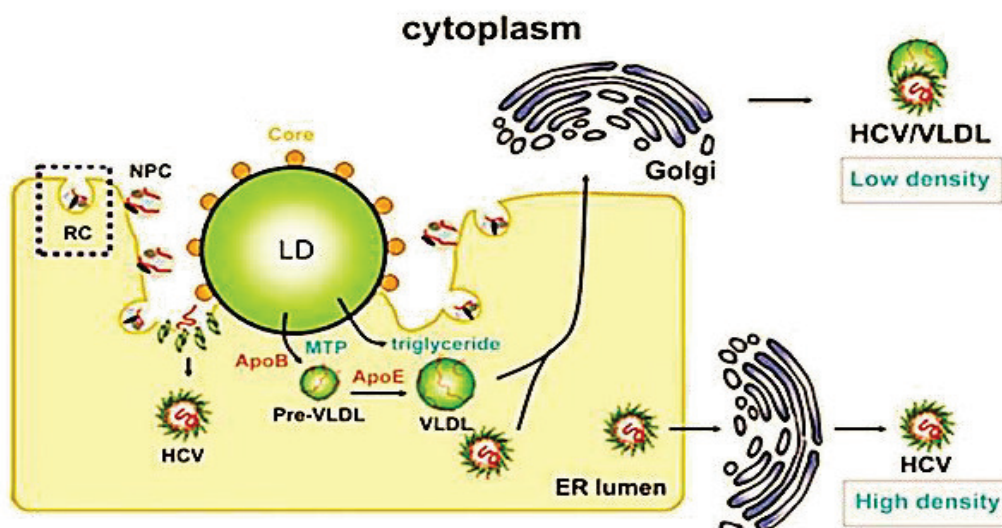
### E. Assemblage et sécrétion des particules virales

L'étude des étapes tardives du cycle viral du VHC, l'empaquetage du génome, l'assemblage des protéines structurales et la sécrétion des particules virales infectieuses, n'est devenu possible que très récemment en raison de la limitation de modèles d'étude permettant la production de particules virales infectieuses en culture cellulaire. Cependant, l'assemblage est probablement déclenché par l'interaction entre l'ARN génomique et la protéine de capsid, qui aboutit à la formation de la nucléocapside par des mécanismes non encore élucidés [185]. En effet, aucun signal d'encapsidation n'a été identifié sur l'ARN viral pour l'instant. De même, il n'est pas connu si d'autres protéines virales s'assemblent avec l'ARN dans la nucléocapside. Il a été confirmé récemment que la protéine de capsid est essentielle pour la production de particules VHC [186], et l'analyse de mutations au niveau des protéines core, p7 et NS2 révèle l'existence d'interactions fonctionnelles entre ces protéines et illustre leur rôle central dans la morphogenèse des virions [186]. En effet, les protéines p7 et NS2 sont essentielles pour l'assemblage et la sécrétion de particules virales infectieuses [187, 188, 191], De plus la protéine NS2 interagit quant à elle avec la protéine p7 ainsi qu'avec la glycoprotéine d'enveloppe E2 et pourrait jouer un rôle dans la formation des particules virales

## INTRODUCTION

en réunissant les glycoprotéines d'enveloppe et les nucléocapsides naissantes [66]. Par analogie avec les flavivirus, les nucléocapsides pourraient ensuite s'envelopper par bourgeonnement à l'intérieur du réticulum endoplasmique, éventuellement sous l'influence d'interactions de la protéine de capsid avec les protéines d'enveloppe et les particules virales pourraient par la suite être excrétées par exocytose.

L'interaction de la protéine de capsid ou des nucléocapsides formés avec le métabolisme cellulaire des lipides pourrait également jouer un rôle dans la maturation des virions et expliquer la présence dans le sang circulant de particules virales associées aux lipoprotéines, qui constituent la majeure partie de la fraction infectieuse. L'assemblage et la sécrétion de particules virales semblent être deux étapes étroitement liées à la synthèse et à la sécrétion des VLDL [189, 190] (**Figure 14**) [335]. Récemment, des vésicules membranaires contenant le complexe de réplication du VHC furent isolées de cellules Huh7 transformées par un réplicon du virus; les analyses protéomiques les ont révélées enrichies en ApoB, ApoE et MTP (Microsomal Transfer Protein) qui sont des protéines requises pour l'assemblage des VLDL [192]. Ainsi, quand des cellules Huh7 produisant constitutivement du VHC infectieux [193] furent traitées par un inhibiteur de MTP ou des ARN interférents spécifiques d'ApoB, la sécrétion tant des VLDL que du VHC fut inhibée [192]. Plusieurs équipes ont déjà montré le rôle essentiel de l'apoE et de la protéine de transfert des triglycérides microsomal (MTP) pour la production de virions infectieux alors que le rôle d'ApoB reste encore très controversé [194].



**Figure 14: modèle d'assemblage et sécrétion des particules virales du VHC**

(Tang et Grise 2009)

## INTRODUCTION

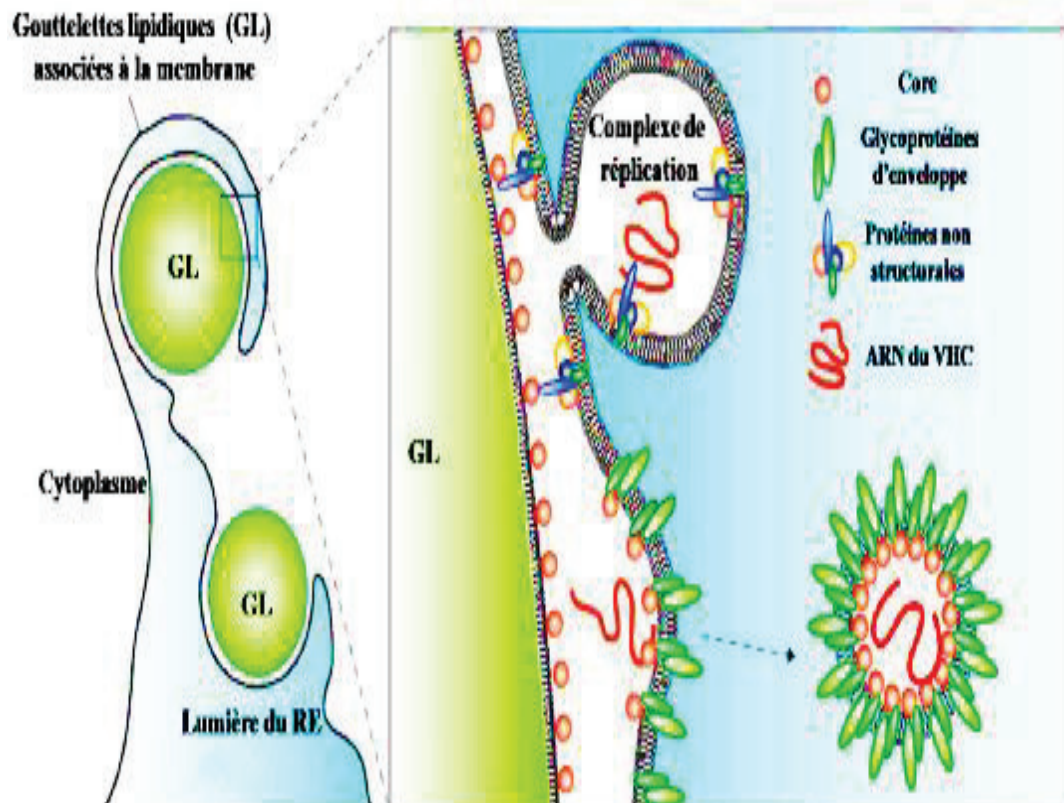
### *1. VHC et gouttelettes lipidiques*

Les gouttelettes lipidiques ont longtemps été considérées comme des inclusions cytoplasmiques inertes, ne servant qu'au stockage intracellulaire de triglycérides et d'esters de cholestérol. Cependant, elles ont connu ces dernières années un regain d'intérêt de la part des biologistes cellulaires, pour finalement acquérir un véritable statut d'organite [195, 196]. La biogenèse de ces organelles dans certaines régions du réticulum endoplasmique est un processus complexe et pas encore bien déterminé. Le modèle le mieux décrit suggère qu'elles pourraient se former par accumulation de triglycérides entre les deux monocouches de phospholipides de la membrane du RE. Après avoir atteint une masse critique, le gonflement de cet espace conduirait alors au bourgeonnement d'une gouttelette entourée d'une monocouche de phospholipides dérivée de la membrane du RE. Elles possèdent donc une monocouche dérivée de ces membranes pouvant contenir diverses protéines (PAT protéines, marqueurs des gouttelettes lipidique) impliquées dans la lipogenèse, la stabilité et le transport des gouttelettes lipidiques [197]. Participant à la régulation de nombreux mécanismes cellulaires, elles représentent des structures extrêmement mobiles et dynamiques, notamment grâce à des mouvements s'effectuant le long des microtubules du cytosquelette [174,257]. Il est donc concevable d'imaginer que la dynamique des gouttelettes lipidiques peut être mise en profit par le VHC pour la production des particules virales infectieuses [258]. Des études *in vitro* datant d'une dizaine d'années ont montré que la protéine core du VHC, initialement adressée aux membranes du réticulum endoplasmique (RE), était aussi retrouvée associée à la surface des gouttelettes lipidiques [198, 199]. La signification de cette association reste à ce jour mal comprise mais elle pourrait être essentielle au cycle infectieux, en particulier pour la morphogénèse des particules virales. Cependant, il a été montré que la protéine de capsid recrute les protéines non structurales et les complexes de réplication au niveau des gouttelettes lipidiques associées aux membranes et que ce recrutement est essentiel pour la production de virus JFH-1 infectieux [200] (**Figure 15**) [335].

Des études complémentaires ont montré que le clivage de la protéine de core par une protéase cellulaire, la SPP est nécessaire pour permettre le trafic de cette protéine vers la surface de ces structures lipidiques [200, 201]. Après ce clivage, la protéine de core du VHC reste ancrée dans la membrane du RE ou associée aux gouttelettes grâce à la présence d'un domaine C terminal hydrophobe [202]. La protéine core, accumulée à la surface des gouttelettes lipidiques induit également une redistribution du centre organisateur des microtubules [203]. La perturbation du réseau des microtubules par des inhibiteurs tel que le nocodazole, bloque

## INTRODUCTION

la redistribution de la capside et induit une baisse de la production de virions [203]. Le fait de perturber la dynamique des gouttelettes lipidiques semble donc influencer l'assemblage et la sécrétion du VHC.



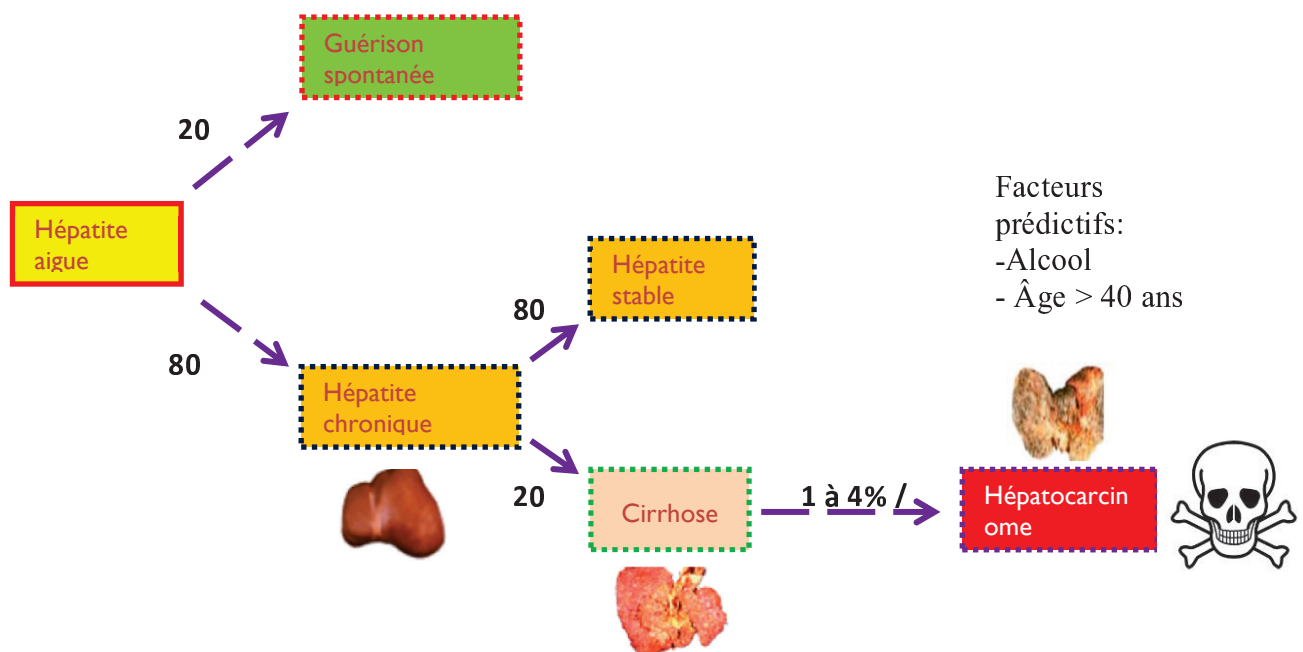
*Figure 15: Modèle pour la production de virions infectieux du VHC. (Tang et Grise 2009)*

## INTRODUCTION

### V. Physiopathologie

#### A. Evolution de la maladie et symptômes cliniques

L'hépatite C est une maladie progressive: la contamination par le VHC provoque une hépatite aiguë qui évolue lentement, dans environ 80% des cas, vers la chronicité. A plus long terme, l'hépatite chronique peut entraîner une cirrhose, voire un hépatocarcinome (**Figure 16**).



**Figure 16: Evolution d'une hépatite causée par le VHC.**

#### B. Hépatite C aiguë

La contamination par le VHC entraîne une hépatite aiguë caractérisée par l'apparition des marqueurs biologiques dans le sang : l'ARN viral devient détectable 1 à 3 semaines après contamination [204], on observe souvent une augmentation transitoire de la concentration sérique en alanine aminotransférases et la séroconversion intervient généralement sous 6 à 8 semaines. Asymptomatique dans la plupart des cas, l'hépatite aiguë entraîne des symptômes généralement passagers chez environ 20% des patients. Chez ces individus, on observe classiquement : fatigue, nausées, douleurs, coloration sombre de l'urine et ictère. Dans la plupart des cas, ces symptômes sont transitoires et leur manifestation coïncide avec l'élévation des transaminases sériques. Le pourcentage de guérison spontanée est faible

## **INTRODUCTION**

puisque environ 80% des individus infectés développent une infection chronique. Les cas d'hépatite fulminante dus à l'infection par le VHC sont extrêmement rares [205]. La guérison de l'infection aiguë est définie par l'absence durable de l'ARN viral dans le sang.

### ***C. Hépatite C chronique***

Dans 60 à 80% des cas, l'hépatite aiguë ne conduit pas à l'élimination du virus et le malade développe une infection chronique, définie par la persistance durable de l'ARN viral au-delà de six mois avec une élévation des ALAT et l'apparition de signes histologiques [206]. Les mécanismes permettant à l'infection chronique de s'installer sont imparfaitement connus. L'émergence de mutants d'échappement à la réponse immunitaire de l'hôte pourrait jouer un rôle fondamental. L'infection chronique, restera asymptomatique dans la majorité des cas. Mis à part une importante fatigue, il n'y a pas de symptômes caractéristiques de l'hépatite chronique. On peut observer, selon le stade hépatique : anorexie, nausées, douleurs musculaires et articulaires, coloration foncée de l'urine, perte de poids. Le diagnostic de l'infection chronique se fait par sérologie et recherche d'ARN viral, il peut être complété par une analyse histologique ce qui permettra d'évaluer l'atteinte hépatique. Le risque de développer une cirrhose semble dépendre principalement de l'intensité de l'hépatite chronique active. Ce risque est très significativement augmenté en présence de facteurs surajoutés comme l'âge, le sexe, le mode de contamination, l'importance de l'inoculum initial, la consommation d'alcool et la co-infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) ou par le VHB [207]. De plus, les troubles métaboliques liés à une action directe du VHC sur les voies de signalisation de l'insuline sont susceptibles d'influencer l'histoire naturelle de l'infection VHC [208]. Ainsi, l'obésité et l'insulinorésistance sont associées à une progression plus rapide de la fibrose en cas d'infection VHC. Globalement, l'incidence de la cirrhose pourrait être de l'ordre de 20% après 10 ans d'évolution de l'infection. Les malades ayant une cirrhose virale C ont un risque élevé de développer un carcinome hépato-cellulaire. Le rôle carcinogène direct du VHC n'est pas très bien établi car, contrairement au HBV, il s'agit d'un virus à ARN dont le génome ne peut s'intégrer à celui de l'hôte et interagir avec lui. Certaines protéines virales (capside) pourraient jouer un rôle dans la carcinogenèse hépatique. Cependant le rôle de la cirrhose dans l'apparition du cancer semble prédominant. Des études récentes indiquent que l'incidence du carcinome hépato-cellulaire est d'environ 5% par an chez les patients atteints de cirrhose virale C.



## **INTRODUCTION**

### ***VI. Carcinogenèse liée du VHC : rôle biologique des protéines virales***

En ce qui concerne le VHC, il n'existe pas de processus d'intégration du génome dans la cellule. Le VHC qui se réplique en permanence est responsable d'une inflammation, d'une stéatose et d'une fibrose pouvant être à l'origine d'une cirrhose et d'un carcinome hépatocellulaire. Le facteur principal de carcinogenèse hépatique est surtout la présence d'une cirrhose. Un rôle direct du virus de l'hépatite C a cependant été suggéré car il a été décrit la survenue de carcinome hépatocellulaire chez des patients ne présentant que des lésions histologiques minimales. Les données de la littérature montrent que certaines protéines virales pourraient interférer avec des mécanismes impliqués dans la carcinogenèse hépatique. Les données publiées portent majoritairement sur la capside virale. Cependant, d'autres protéines virales peuvent aussi interférer. Ces interférences sont détaillées ci-dessus.

#### ***A. Rôle de la capside***

Le rôle possible dans la carcinogenèse est étayé par les expériences sur les modèles animaux ou l'expression de la capside dans le foie de souris transgéniques induit le développement d'un CHC [209, 210].

##### ***1) Modulation de l'expression des gènes.***

La protéine de capside peut moduler l'expression de plusieurs gènes cellulaires. Les nombreuses études ayant révélées ces interactions reposent le plus souvent sur des modèles expérimentaux éloignés de la réalité clinique, en particulier sur des systèmes d'expression transitoire dans des lignées cellulaires. Certaines de ces interactions devraient être réétudiées dans le contexte de nouveaux modèles de culture cellulaire du VHC. La capside du VHC se lie aux protéines suppressives de tumeur p53 [211, 212], p73 [213] et pRb [214] mais les conséquences fonctionnelles de ces interactions ne sont pas complètement élucidées. La capside module l'expression de p21waf1 qui est un inhibiteur de CDK [215]. La capside module l'expression de p21waf1 qui est sous le contrôle transcriptionnel de p53 et régule les actions des complexes cycline/CDK impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire [211, 217, 218, 219].

La capside interagit de façon indirecte avec des signaux de transduction cytoplasmiques entraînant une modulation de la transcription des gènes dépendants de ces cascades. Plusieurs études ont montré que la voie de signalisation Raf1/MAPK (Mitogen-Activated Protein

## **INTRODUCTION**

Kinase) [220, 221] et Wnt/ $\beta$ -caténine était activée par la capside du VHC ayant pour conséquence une prolifération cellulaire [222, 223].

L'analyse par microarray montre des modifications transcriptionnelles significatives pour environ 5% des gènes étudiés dans les cellules surexprimants la capside. Parmi ces facteurs transcriptionnels surexprimés, on retrouve des gènes impliqués dans la croissance cellulaire, dans les signaux oncogéniques, dans le métabolisme lipidique et dans les mécanismes associés à l'immunité ou la réponse inflammatoire [223, 224].

En résumé, la protéine de capside apparaît donc comme une protéine cytoplasmique multifonctionnelle capable de moduler plusieurs voies principales de transduction avec un effet sur la prolifération et la viabilité cellulaire.

### ***2) Interactions avec le système immunitaire***

La protéine de capside a la propriété de pouvoir se lier au domaine cytoplasmique de plusieurs membres de la famille du récepteur du TNF. Cette propriété confère à la capside la possibilité de moduler des fonctions immunitaires de la cellule hôte et par ce mécanisme d'évoluer à la chronicité. Il a été suggéré également que la capside pouvait favoriser la persistance de l'infection chronique par une action immunosuppressive sur les lymphocytes T liée à ses interactions avec le récepteur du complément C1qR [225].

### ***3) Rôle dans le métabolisme lipidique***

Il a été fréquemment constaté l'existence d'une stéatose lors de l'examen histologique des patients atteints d'infection par le VHC. De plus, l'expression de la protéine de capside du VHC dans des souris transgéniques induit une stéatose et une hépatite chronique, qui précèdent la survenue d'un carcinome hépatocellulaire après le 10ème mois de vie [226, 227]. La protéine de capside est associée à la membrane qui entoure les gouttelettes lipidiques dans les cellules infectées [228]. Par ailleurs, il a été montré que la protéine de capside inhibait la sécrétion de l'apolipoprotéine AII et les lipoprotéines de très faible densité [229, 230]. Ces actions contribueraient à l'accumulation de lipides dans les cellules infectés et donc à l'apparition de stéatose. L'expression de la protéine de capside semble également entraîner un stress oxydatif, ayant pour conséquence une réduction du métabolisme mitochondrial, le développement d'une stéatose et un effet prolifératif par l'altération des fonctions de réparation des anomalies des acides nucléiques. *In vivo*, il a été montré que l'expression de la capside dans des souris transgéniques était responsable d'une augmentation de la



## **INTRODUCTION**

peroxydation lipidique, d'une stéatose [227]. L'ensemble de ces phénomènes de stress oxydatif de stéatose combinés à la modulation de l'apoptose semble montrer des propriétés transformantes [231, 232].

### ***4) Effets sur l'apoptose***

La protéine de capsid peut moduler l'apoptose en l'induisant ou en l'inhibant en fonction des conditions expérimentales. L'inhibition passe probablement par la modification de certains gènes cellulaires. En effet, il a été montré in vitro que le récepteur du TNF (tumor necrosis factor) et de la lymphotoxine bêta [233] interagissent avec la capsid et ces effets semblent jouer un rôle dans l'inhibition de l'apoptose [234, 235].

### ***B. Rôles des autres protéines virales***

Les propriétés oncogéniques de la protéine NS3 et de NS5A pourraient passer par une interaction avec le suppresseur de tumeur p53 [236]. Les résultats fonctionnels de cette interaction sont une répression (NS3-dépendante) de la transcription du gène p21Waf1 qui intervient dans la régulation du cycle cellulaire [237, 238].

La protéine E2 semble avoir des interactions avec PKR dont l'action est impliquée dans la défense contre les infections virales [239, 240]. E2 présente aussi par ses interactions avec les récepteurs cellulaires des interactions avec le système immunitaire de l'hôte (récepteur CD81 et du TNF $\alpha$ ) pouvant moduler l'activation lymphocytaire.

## ***VII. Tropisme hépatique et cibles extra-hépatiques***

Le tropisme du VHC est principalement hépatocytaire. Le foie est le site majeur de la réplication du VHC et contient une forte abondance d'ARN VHC [241, 242]. La proportion d'hépatocytes présentant un brin d'ARN VHC de polarité négative détectable semble corrélée au niveau d'élévation de l'activité des transaminases et aux changements histologiques. La présence de ces brins d'ARN VHC de polarité négative est en faveur d'une réplication du virus. Outre le tropisme hépatique du VHC, certaines évidences suggèrent l'existence d'une réplication dans des réservoirs extra-hépatiques incluant les lymphocytes du sang périphérique [243], les cellules intestinales et le système nerveux central [244, 245]. Plusieurs études conduites au cours des dernières années ont décrit la présence des brins génomiques viraux, c'est-à-dire le brin positif et le brin négatif, dans les lympho-monocytes de la plupart des porteurs chroniques [246, 247]. L'autre argument pour l'existence d'une réplication

## **INTRODUCTION**

extra-hépatique est l'apparition dans ces sites, de variants significativement différents de ceux circulant dans le plasma ou infectant le foie. On parle ainsi de compartimentation des variants viraux [248]. De plus, Les corrélations entre l'infection par le VHC et la présence de cryoglobulinémie et le développement de lymphomes non hodgkiniens suggèrent un tropisme extra-hépatique du VHC [249].

### ***VIII. Les stratégies thérapeutiques***

Depuis l'identification du VHC en 1989, le traitement de l'hépatite C s'est considérablement amélioré. Les traitements actuels sont basés sur l'utilisation de l'interféron- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) et la ribavirine. L'IFN- $\alpha$  agit comme l'IFN endogène : il induit la réponse antivirale dans les cellules infectées, augmente la lyse des cellules infectées, diminue la réplication virale et réduit la fibrose hépatique [216]. La conjugaison de l'IFN- $\alpha$  au polyéthylène-glycol (PEG-IFN- $\alpha$ ) a permis d'améliorer la stabilité et la biodisponibilité de l'IFN, et donc de réduire la fréquence d'administration. La ribavirine (1-b-D-ribofuransyl-1,2,4-triazol-3- carboxamide) est un analogue nucléosidique de la guanosine ayant un effet antiviral sur de nombreux virus. La ribavirine inhibe directement la polymérase du VHC et possède un rôle immuno-modulateur [291]. Globalement, la bithérapie PEG-IFN- $\alpha$  + ribavirine permet d'obtenir une réponse virologique prolongée chez 80% des patients infectés par le VHC de génotype 2 ou 3. Néanmoins, les réponses en ce qui concerne les autres génotypes sont beaucoup plus mitigées puisque seulement 50% des patients répondent à cette bithérapie [292]. En outre, de nombreux effets secondaires au traitement sont observés et ont un impact important sur la qualité de vie des patients. Aussi, face au coût, à la toxicité et à l'efficacité limitée des traitements, le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques est nécessaire. À l'heure actuelle, plusieurs molécules sont en phase clinique. Certaines d'entre elles visent à améliorer le traitement actuel et sont alors basées sur l'IFN et la ribavirine.

Une des stratégies dans les traitements actuels cible plus spécifiquement le virus, comme les inhibiteurs de la protéase NS3/4A tels que le Telaprevir (VX-950) (Laboratoire Vertex) et le Boceprevir (SCH 503034) (Laboratoire Merck). Ces deux molécules en combinaison avec le traitement standard semblent augmenter le taux de guérison tout en réduisant le temps de traitement chez certaines personnes infectées [65].

## **INTRODUCTION**

Des essais de vaccination sont également en cours de développement. Plusieurs études basées sur l'induction de réponses cellulaires donnent des résultats encourageants. Notamment la vaccination de chimpanzés à l'aide d'un vecteur adénoviral combinée à l'électroporation avec un plasmide codant les protéines NS3 à NS5B permet de protéger ces animaux de l'infection par des virus de séquences hétérologues [293]. Cependant, l'apparition de variants d'échappement pourrait diminuer l'efficacité des stratégies de vaccination basées sur l'induction de la réponse cellulaire. Par ailleurs, une étude récente montre que la vaccination au moyen d'ADN et d'un adénovirus exprimant les protéines virales Core, E1, E2, NS3, NS5A et NS5B induit la production d'anticorps dirigés contre la glycoprotéine E2 qui est corrélée avec une réduction du pic de la charge virale [294].

Comme tous les virus, le VHC n'est pas un organisme autonome, c'est un parasite obligé qui dépend de la cellule qu'il infecte pour la réplication de son génome et la production de ses constituants (protéines, enveloppe...). Il entretient donc, une relation particulière avec la cellule hépatocytaire dans la mesure où il en exploite les ressources. Il détourne le fonctionnement de la cellule à son profit tout en la ménageant pour que les ressources cellulaires ne s'épuisent pas prématurément.

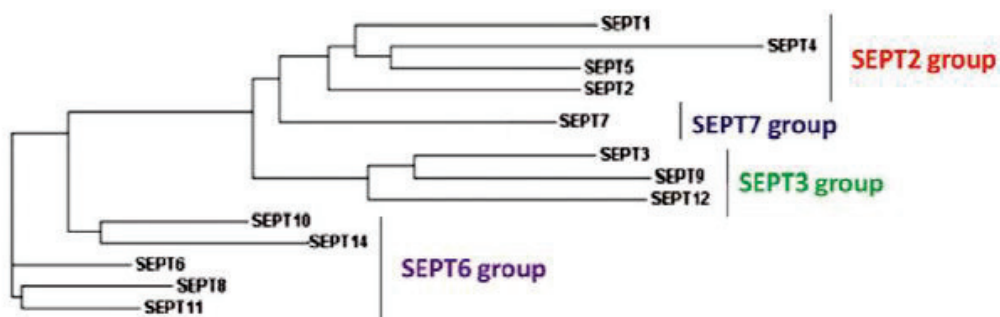
L'infection par le VHC se traduit par un niveau élevé de réplication virale tout au long de la progression vers le stade chronique. La réplication et La propagation du VHC dans les hépatocytes met en jeu des événements moléculaires impliquant des interactions dynamiques entre les composants viraux et les protéines cellulaires. La dernière partie des travaux de cette thèse en cotutelle vise à identifier et caractériser des facteurs cellulaires essentiels à la réplication du VHC, dans l'objectif est de définir de nouvelles cibles thérapeutiques.

Dans ce travail, nous avons pu identifier la septine 9 comme facteur cellulaire impliqué dans le cycle de vie virale du VHC, ainsi que les protéines PIAS1 et SUMO1 comme facteur régulateurs de la septine 9. De plus nous avons pu établir la relation de ces protéines cellulaires dont la présence est nécessaire à la fois à la production des protéines virales (Core et E2) et à la réplication du virus dans la cellule hôte.

## INTRODUCTION

### IX. Structure, Fonctions cellulaires des Septines

Initialement identifiée chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, les septines constituent une famille de GTPases, organisées en complexes hétéro-oligomériques qui s'assemblent en structures d'ordre supérieur pour former des filaments ou des anneaux [282]. Impliquées depuis longtemps dans la cytokinèse, et l'organisation du cytosquelette de microtubules et d'actine [283]. Il semble aujourd'hui qu'elles jouent aussi un rôle majeur dans la compartimentation et la morphogenèse cellulaire [277]. Le nombre de gènes codant pour les septines varie de deux chez *C.elegans* (nommées UNC-59 et UNC-61) à treize connus à ce jour chez l'Homme (nommés *SEPT1* jusqu'à *SEPT12* et *SEPT14*) auxquels on peut ajouter quatorze pseudogènes [258]. Par ailleurs, les transcrits de nombreux gènes peuvent subir un épissage alternatif (auxquels peuvent s'ajouter des phénomènes épigénétiques) augmentant, ainsi le nombre d'isoformes [277]. Des analyses phylogénétiques ont permis de classer les septines humaines en quatre groupes selon leur homologie de séquence et le nombre de domaines « coiled-coil » qu'ils contiennent : les groupes SEPT2, SEPT3, SEPT6 et SEPT7 (*Figure 17*) [258].



*Figure 17 : Arbre phylogénétique de la famille des septines humaines*

*( Peterson and Petty 2010)*

Malgré cette diversité, toutes les septines ont une structure commune. Des analyses de similarités de leur séquence en acides aminés, ont montré que les septines présentent une région central très conservée, contenant un domaine polybasique [259], responsable de l'association des septines avec les phospholipides des membrane cellulaire [260] et un autre domaine qui lie et hydrolyse le GTP [258, 260] (*Figure18*) [259]). Les régions N-et C-

## **INTRODUCTION**

terminales varient en longueur et en composition d'acides aminés, et contiennent respectivement des domaines variables riches en proline et/ ou des domaines en superhélice  $\alpha$  appelés « coiled-coil » [259]. Ce domaine C-terminal est impliqué dans les interactions homotypiques et hétérotypiques, aussi bien entre certaines septines entre elles qu'entre les septines et d'autres [259].



*Figure 18 : structure générale des septines chez les mammifères*

*(Spiliotis and Nelson 2006)*

### ***X. Septines et Physiopathologie***

Plusieurs lignes d'évidence indiquent que la famille des septines est impliquée dans diverses pathologies humaines, comme notamment certains cancers ou récemment certaines infections bactériennes [261].

#### ***A. Septines et cancers***

Des septines humaines ont été impliquées dans différents types de cancers. Une récente étude sur l'expression de tous les membres des septines humaines a été menée dans 35 types de cancers [262]. Cette étude montre une expression altérée de plusieurs septines dans différents types de cancers. En particulier, SEPT2, SEPT8, SEPT9 et SEPT11 se retrouvent surexprimées dans la plupart des cancers, alors que les SEPT4 et SEPT10 sont sous-exprimées. Par ailleurs, les expressions altérées de SEPT4, SEPT9 et SEPT10 ont également été significativement associées avec l'agressivité de la tumeur ou son pronostic [262].

#### ***B. Septines et maladies infectieuses***

Le processus par lequel les pathogènes intracellulaires entrent et se déplacent dans les cellules dépend d'interactions avec le cytosquelette [263, 264, 265]. Il a été démontré que SEPT9 est un composant de la machinerie impliquée dans le mouvement de la bactérie *Listeria*

## **INTRODUCTION**

*monocytogenes* autour des cellules HeLa [263, 266]. Il est possible que d'autres pathogènes, incluant les virus [265] et les bactéries puissent utiliser des processus dépendant des septines [267].

Ces résultats démontrent l'importance de la famille des septines dans la carcinogenèse et les infections bactériennes et virales, et pourraient permettre d'identifier de nouvelles septines associées au cancer et aux infections, ainsi que leurs rôles dans le développement de ces pathologies humaines.

### ***C. Septine 9***

L'intérêt grandissant pour la septine 9 (SEPT9) a commencé après que des travaux ont montré un lien entre la protéine et certaines maladies comme la leucémie ou les troubles neurologiques [268].

Le gène *SEPT9* se situe dans une région de déséquilibre allélique au niveau du chromosome 17q25.3 dans le cancer du sein [269] et le cancer sporadique de l'ovaire [270]. De plus, il existe une expression différentielle des isoformes de SEPT9 dans les tumeurs de différents tissus [271]. Aussi, une récente étude a montré que la méthylation de l'ADN était un mécanisme important responsable d'une régulation d'expression différentielle d'isoformes de SEPT9, et que des échantillons de tumeurs mammaires montrent une localisation intracellulaire distincte de SEPT9 [272]. Encore, l'ADN de *SEPT9* méthylé circulant dans le plasma a été récemment identifié comme biomarqueur d'intérêt pour une détection peu invasive du cancer colorectal. Ceci a conduit au développement d'un nouveau test de méthylation (m)SEPT9 qui pourrait s'avérer utile en recherche clinique pour la détection du cancer colorectal invasif par un simple prélèvement sanguin des patients [273].

Le locus de *SEPT9* donnait lieu à de multiples transcrits alternatifs codant au moins six isoformes, annotés SEPT9\_v1 à SEPT9\_v5 [274]. La raison biologique de la présence de multiples isoformes de *SEPT9* n'est pas encore élucidée, mais beaucoup d'études, et notamment des analyses d'expression, montrent que ces isoformes sont différentiellement exprimées et peuvent avoir des spécialisations fonctionnelles distinctes dans les cellules de mammifères.

SEPT9\_v1 a récemment été caractérisé comme un important isoforme de la septine 9 qui intervient dans des processus cellulaires autres que la division, par ex. le transport vésiculaire ou l'organisation des membranes et du cytosquelette [278]. Récemment, des études ont suggéré une affiliation forte de SEPT9\_v1 avec des phénotypes oncogènes dans des cellules cancéreuses [279], cependant, les mécanismes moléculaires par lesquels SEPT9\_v1 promet la

## **INTRODUCTION**

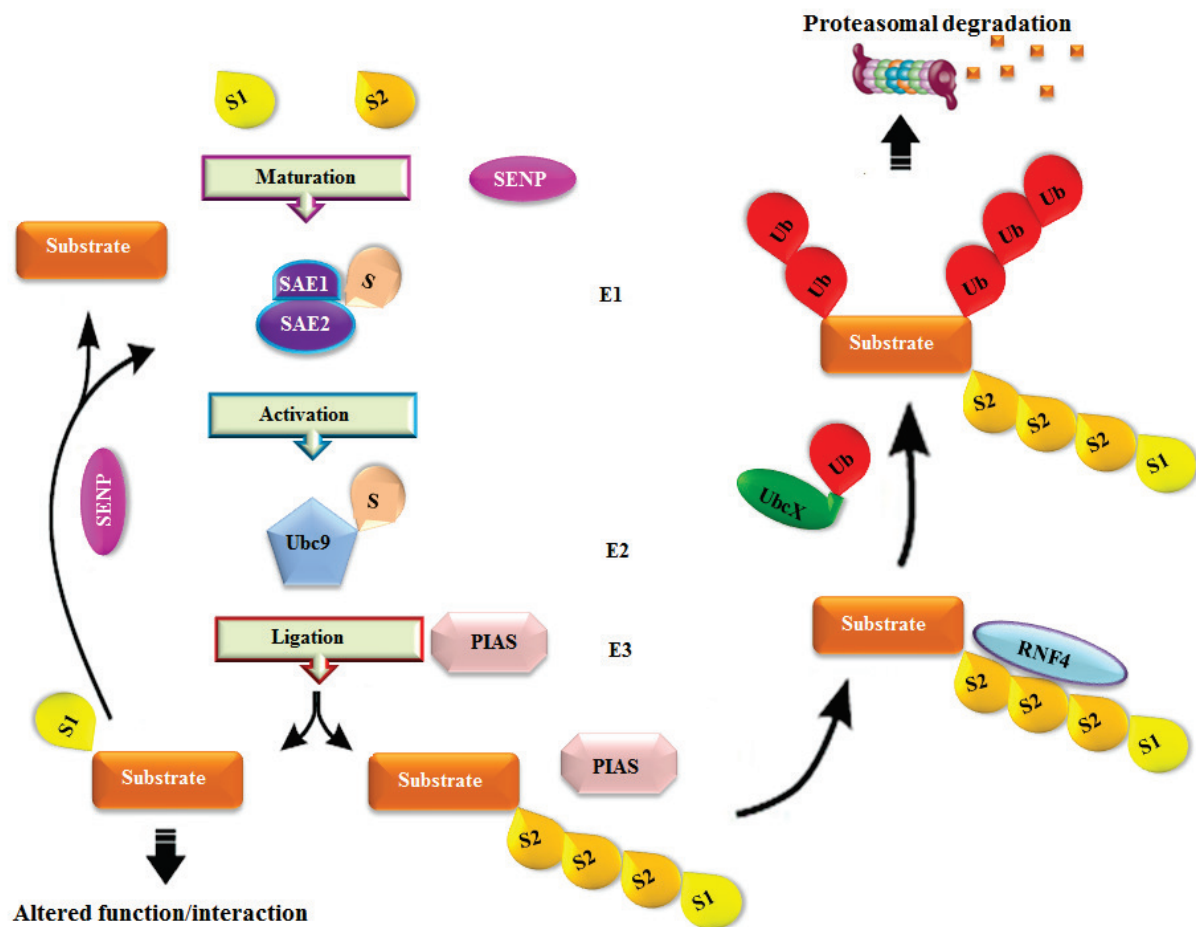
tumorigenèse et la transformation cellulaire dans des cellules épithéliales mammaires ne sont pas encore élucidés. SEPT9\_v1 a aussi été fonctionnellement lié avec l'angiogenèse par son activation du facteur d'hypoxie-inducible 1 (HIF-1), qui promeut la progression tumorale du cancer de la prostate. Spécifiquement, la surexpression de la SEPT9\_v1 a été associée à l'activation de HIF-1 et l'augmentation accrue des taux de prolifération cellulaires [280]. Enfin, SEPT9\_v1, pourrait devenir un biomarqueur important dans la résistance de nombreux cancers à des agents ciblant les microtubules. L'expression de SEPT9\_v1 a fortement été corrélée avec la sensibilité d'un grand nombre de cellules cancéreuses à des agents thérapeutiques comme le paclitaxel [275]. En général, les cellules cancéreuses avec une expression élevée de SEPT9\_v1 se montrent plus résistantes à ces médicaments anticancéreux (Amir and Mabjeesh 2007).

### ***D. Septines et SUMOylation***

Les septines peuvent subir des modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation, l'ubiquitination ou la SUMOylation, qui semblent pouvoir réguler la dynamique de polymérisation des complexes de septines. La SUMOylation est une modification post-traductionnelle aboutissant à la liaison covalente d'une ou plusieurs protéines SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier) sur une lysine de la protéine. Le processus de sumoylation est très proche biochimiquement de l'ubiquitination, en impliquant une cascade similaire d'enzymes (**Figure 19**). En revanche, alors que l'ubiquitination entraîne principalement la dégradation par le protéasome de la protéine ciblée, la sumoylation semble plutôt réguler les propriétés biochimiques des protéines cibles et jouer un rôle dans de nombreuses fonctions (trafic intracellulaire, interactions protéiques, interaction ADN protéine, activité transcriptionnelle...) [276]. Les protéines SUMO sont exprimées sous une forme immature. Ainsi, la réaction de sumoylation commence par une étape de maturation des protéines SUMO, qui correspond au clivage de leur extrémité C-terminal. Ce clivage est assuré par des enzymes carboxyhydroxylases de la famille SENP (sentrin-specific protéase) et permet de rendre accessible le dipeptide de glycine afin de permettre l'interaction de SUMO avec l'enzyme d'activation E1. La deuxième étape, dite d'activation, consiste en la création d'une liaison thioester de haute énergie (étape ATP-dépendante) entre SUMO et la cystéine catalytique de l'enzyme E1 activatrice (hétérodimère SAE1/SAE2). Dans une troisième étape, dite de conjugaison, SUMO est transférée depuis l'enzyme d'activation E1 sur la cystéine catalytique de l'enzyme de conjugaison E2(Ubc9). Enfin le processus de sumoylation

## INTRODUCTION

s'achève par étape dite de ligation, l'enzyme E2 transfère SUMO sur la protéine substrat par la formation d'une liaison isopeptidique entre la glycine de l'extrémité C-terminale de SUMO et la lysine de la protéine substrat. Contrairement à l'ubiquitination, cette dernière étape fait intervenir des enzymes E3 sumo ligase qui permettent notamment de stabiliser l'interaction de l'enzyme E2 avec le substrat et de conférer la spécificité vis-à-vis du substrat. Actuellement, trois familles d'E3 ligase ont été caractérisées : la famille des protéines PIAS, celle des protéines RanBP2 et celle du groupe polycomb Pc.



**Figure 19: Schéma général du processus de Sumoylation.** L'étape de maturation, correspond au clivage de la partie C-terminale de la protéine SUMO pour donner une protéine SUMO activée, arborant un dipeptide de glycine (GG). Le clivage est assuré par des enzymes carboxy-hydrolases de la famille des Protéases Sentrine (SENp). L'étape d'activation, consiste en la création d'une liaison thioester (étape ATP-dépendante) entre le dipeptide GG de SUMO et la cystéine catalytique de l'enzyme E1 (hétérodimère SAE1/SAE2). L'étape de conjugaison de SUMO permet le transfert de SUMO depuis l'enzyme E1, sur la cystéine catalytique de l'enzyme E2 (Ubc9). Enfin le processus de sumoylation s'achève par l'étape de ligation de SUMO, par l'enzyme E2, sur la lysine acceptrice d'une protéine cible. Dans la grande majorité des cas cette dernière étape fait intervenir des enzymes E3 qui permettent notamment de stabiliser l'interaction de l'enzyme E2 avec le substrat et de conférer la spécificité vis-à-vis du substrat. Enfin, SUMO peut être clivée du substrat par les SENp.



## INTRODUCTION

### XI. La famille PIAS

La famille des protéines PIAS (Protein Inhibitor of Activated STAT) a été découverte chez la levure par la liaison de certains de ses membres avec les protéines STAT [284]. Elle est constituée chez les eucaryotes de PIAS1, PIAS3, PIASx $\alpha$ / $\beta$ , and PIASy [285]. Les protéines PIAS partagent une structure commune avec plusieurs domaines conservés (**Figure 20**) [290]. En général cinq domaines différents ou motifs ont été identifiés ; dans leur partie N-terminal, les protéines PIAS contiennent des domaines SAP (scaffold attachment factor-A/B, acinus and PIAS), ces séquences conservées LXXLL, favorisant la liaison entre les protéines PIAS et des récepteurs nucléaires [286]. Les protéines PIAS contiennent un motif PINIT, qui a été montré être essentiel pour la rétention nucléaire. La famille PIAS présente un domaine central très conservé contenant un motif qui lie le zing, le domaine RING, comparable à celui des enzymes E3-ligases. Une étude récente suppose que le domaine RING en association avec le motif PINIT pourrait former un module à activité E3- sumo- ligase [287]. Enfin la région C-terminale est moins bien conservée entre les différents membres (absente pour PIASy) et contient un domaine très acide et une région très riche en sérine et thréonine [288].

Toutes les protéines de la famille PIAS peuvent réguler l'expression de gènes de manière positive ou négative, principalement au niveau de la transcription. Bien que leur mécanisme d'action diffère selon leur cible, elles semblent principalement agir en relocalisant des régulateurs transcriptionnels dans différents sous-compartiments cellulaires [285]. De nombreuses cibles des protéines PIAS ont été identifiées (p53, c-Jun, LEF-1, IRF-1, STAT-1) [289]. Finalement, un autre rôle a dernièrement été attribué aux PIAS. Elles agiraient en tant que ligases E3 lors de la sumoylation [289, 290].

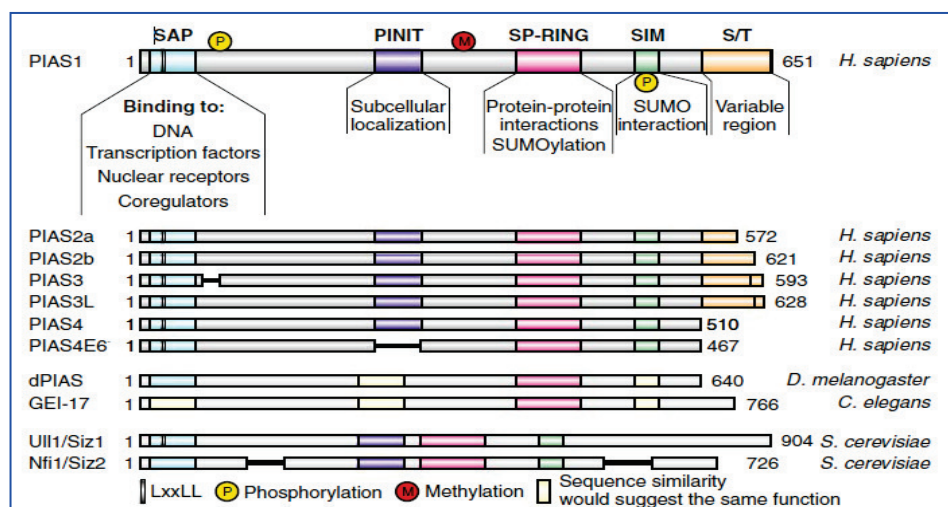


Figure 20 : Structure des protéines PIAS (Rytinki et al (2009))

OBJECTIFS

## **OBJECTIFS**

Le développement du carcinome hépatocellulaire est la conséquence de mécanismes complexes et multifactoriels. La méconnaissance des partenaires impliqués dans l'initiation et la progression tumorale (l'hôte, le virus...) peut contribuer à l'échec thérapeutique. Mieux identifier et caractériser les acteurs du CHC permettra d'optimiser les traitements actuels et futurs, et d'améliorer la prise en charge des patients.

Dans un premier temps, au sein de l'équipe du Dr Soumaya Benjelloun à l'Institut Pasteur du Maroc l'objectif de mon travail a été d'identifier des SNPs de prédisposition au CHC dans une collection de population d'origine marocaine atteinte de carcinome hépatocellulaire. Pour atteindre cet objectif, on a appliqué des stratégies de « gènes candidats » et « cas-témoins » afin de découvrir d'autres facteurs génétiques de prédisposition au CHC. Ces stratégies nous ont conduits à constater que les génotypes Val997Val du gène p300 et Ser386Ser de pcaf présentent une susceptibilité génétique significative au carcinome hépatocellulaire.

Le CHC représente à l'échelle mondiale la troisième cause de mortalité par cancer et son incidence est en constante augmentation dans le monde. C'est également l'un des rares cancers humains associés à des infections virales : l'infection chronique par le virus de l'hépatite B, et l'infection chronique par le virus de l'hépatite C. L'hépatite C chronique reste un facteur de risque majeur associée au développement d'une stéatose et d'une fibrose pouvant conduire à la cirrhose et au carcinome hépatocellulaire (CHC). Malgré l'importance des connaissances accumulées sur le VHC depuis 1989, une fraction importante de patients ne répond pas au traitement antiviral. Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires qui permettent l'établissement et le maintien d'une infection persistante par le VHC devrait permettre le développement de nouvelles stratégies antivirales visant à l'éradication de l'infection virale et la prévention ou la régression des pathologies associées (stéatose, fibrose, CHC).

Étant donné que la variabilité génétique du VHC peut avoir un impact sur la carcinogenèse hépatique, une partie de mes travaux de recherche a consisté à mieux caractériser la variabilité génétique du VHC et l'épidémiologie des souches virales circulantes dans un échantillon de population marocaine, pour lesquelles peu de données étaient disponibles (annexes).. Les analyses phylogénétiques des régions NS5B et core et les données épidémiologiques recueillies ont permis de répondre à ces questions. L'épidémiologie moléculaire du VHC a montré la présence des sous types 1b (75.2 %), 2i (19.1 %) et 2k (2.8 %).

## **OBJECTIFS**

D'autre part, l'identification de nouvelles modalités d'interaction du VHC avec sa cellule cible, l'hépatocyte est perçue comme nécessaire à l'amélioration des chances de succès thérapeutiques. Dans ce contexte, la dernière partie de mes travaux de thèse en cotutelle entre l'Université Paris Sud 11 et l'Université Mohammed V Agdal vise à identifier et caractériser des facteurs cellulaires essentiels à la réplication du VHC, afin de définir de nouvelles cibles thérapeutiques. La réplication et la propagation du VHC dans les hépatocytes met en jeu des événements moléculaires impliquant des interactions dynamiques entre les composants viraux et les protéines cellulaires. Dans ce travail, nous avons pu identifier la septine 9 comme facteur cellulaire impliqué dans le cycle viral du VHC. Nous avons révélé que le VHC recrute et favorise l'assemblage de la septine 9 en filaments. En plus, nous avons pu identifier PIAS1 et SUMO1, comme protéines indispensables à la régulation de la septine 9, à la production des protéines virales (core et E2) et à la réplication du VHC dans la cellule hôte. Ce travail a apporté des perspectives sur les mécanismes cellulaires exploitées par le VHC pour sa réplication, permis la compréhension de la relation entre le VHC et son hôte et ouvrent des nouvelles voies thérapeutiques.

RESULTATS

ET

*Discussions*

## **RESULTATS ET DISCUSSIONS**

### ***XII. Résultats et discussions***

#### **A. Partie I : Association des SNPs EP300 Ile997Val et PCAF Asn386Ser avec Le carcinome hépatocellulaire**

## **Associations of Genetic variants in the Transcriptional coactivators EP300 and PCAF with Hepatocellular Carcinoma**

Abdellah Akil, Sayeh Ezzikouri, Abdellah Essaid El Feydi, Mustapha Benazzouz, Rajaa Afifi, Ama Gassama Diagne, Aziz Benjouad, Anne Dejean, Pascal Pineau, Soumaya Benjelloun

*Publié en 2012 dans Cancer Epidemiology*

## RESULTATS ET DISCUSSIONS

### **1. Introduction 1**

Le carcinome hépatocellulaire résulte probablement des effets de multiples variants génétiques à effet modeste (*Single Nucleotide Polymorphisms* : SNPs) et d'autres facteurs de risque (infections virales VHB et ou VHC.....). Ces SNPs peuvent avoir un impact important au niveau de la population si leur fréquence est élevée.

L'objectif de la première partie de ma thèse a été d'identifier des facteurs de susceptibilité génétique au carcinome hépatocellulaire, par les approches « gène-candidat » et « cas-témoins » en utilisant des outils génétiques et moléculaires. Deux gènes candidats p300 et pcaf ont été sélectionnés en fonction de leur implication avec d'autres cancers et leurs fonctions. Ces approches, réalisées sur 94 patients atteints de CHC et 220 témoins, ont conduit à l'identification de deux SNPs de prédisposition, pouvant être impliqués dans l'étiologie du CHC : les génotypes Ile997Val du gène p300 et Asn386Ser du gène pcaf.

#### **a. Caractéristiques des populations étudiées**

L'échantillon recueilli à l'hôpital Universitaire Ibn Sina de Rabat-Maroc est constitué de 94 malades atteints de CHC dont l'âge moyen est de 60 ans, avec 54 hommes (57.5%) et 40 femmes (42.5%), le sexe ratio est égal à 1.35. La population de 220 témoins était appariée aux malades selon l'âge et le sexe. Ces témoins se répartissaient en 127 hommes (57.7%) et 93 femmes (42.3%), avec un sexe ratio de 1.36 et une moyenne d'âge de 56 ans.

Ces échantillons sont recueillies dans le but de comparer la prévalence et la répartition des génotypes Ile997Val et Asn386Ser entre les malades et les témoins afin d'identifier des polymorphismes de prédisposition pouvant être liés au carcinome hépatocellulaire.

#### **b. EP300 : Distribution des génotypes**

Dans le cas CHC, 69.1% des patients sont homozygotes communs (Ile/Ile), 21.3 % sont hétérozygotes (Ile/Val) et 9.4% sont homozygotes variants (Val/Val), ce qui donne une fréquence de l'allèle variant Val de 20% environ. Par contre dans la population témoin, 69.5% des patients sont homozygotes communs (Ile/Ile), 27.3% sont hétérozygotes (Ile/Val) et 3.2% sont homozygotes variants (Val/Val), ce qui donne une fréquence de l'allèle variant Val de 16% environ.

## RESULTATS ET DISCUSSIONS

Après avoir vérifié que les caractéristiques cliniques de base n'étaient pas différentes entre les 2 groupes, nous avons mis en évidence que le génotype Val/Val de p300 était un facteur de risque significatif de développement du CHC. Ce risque étant multiplié par près de 3 chez les porteurs de ce génotype (OR= 3.026, 95% CI = 1.081-8.473, P= 0.028).

Nous avons mené une étude statistique multivariée et mis en évidence, après ajustement sur l'âge, le sexe et les autres facteurs de risque du carcinome hépatocellulaire, que les patients de sexe féminins porteurs du génotype Val/Val présentent un risque élevé de développer un CHC que les patients du sexe masculins porteurs du même génotype. De plus, notre étude, n'a révélée aucune association entre ce variant prédisposant au CHC et les autres facteurs de risque menant au CHC tel que le VHC, ce qui suggère une association directe de ce SNP au CHC (OR= 1.019, 95% CI = 0.604-1.7201.62, P= 0.944).

### c. PCAF : Distribution des génotypes

Sur les 94 patients atteints de CHC, pour le polymorphisme *PCAF* Asn386Ser, 93.6% sont homozygotes commun (Asn/Asn), 4.3% sont hétérozygotes (Asn/Ser) et 2.1% sont homozygotes variants (Ser/Ser), ce qui donne une fréquence de l'allèle variant Ser de 4% environ. En ce qui concerne les témoins, 88.2% sont homozygotes commun (Asn/Asn), 11.8% sont hétérozygotes (Asn/Ser) et 0% sont homozygotes variants (Ser/Ser), la fréquence de l'allèle variant Ser étant de 5.5% environ.

Après avoir vérifié que l'équilibre de Hardy-Weinberg était respecté pour ce SNP (P= 1.00) et que les caractéristiques cliniques de base n'étaient pas différentes entre les 2 groupes, il est ainsi apparu que le génotype Ser/Ser était plus fréquent chez les patients atteints de CHC que les témoins (2.1% vs. 0%, P= 0.037).

Nous avons en plus mené une étude statistique multivariée et mis en évidence, après ajustement sur l'âge, le sexe et les autres facteurs de risques du carcinome hépatocellulaire, que les patients de sexe masculins porteurs du génotype Ser/Ser présentent un risque élevé de développer le CHC (OR=10.62, 95% CI, 0.500-225.130) par rapport aux porteurs du génotype Asn/Asn du même sexe. De plus, l'étude combinée de ce génotype avec l'autre facteur de risque viral, le VHC, a révélée que les porteurs du génotype Ser/Ser sont particulièrement protégés contre l'infection par le VHC (OR=11.7, 0.470-295.560, NS). Ce qui suggère l'absence d'une association entre ce variant prédisposant au CHC et l'infection par le VHC, évalué par la suite sa prédisposition génétique individuelle au CHC.



### **Associations of Genetic variants in the Transcriptional coactivators EP300 and PCAF with Hepatocellular Carcinoma**

**Running title: EP300 and PCAF polymorphisms and liver cancer**

Abdellah Akil<sup>1,3,4</sup>, Sayeh Ezzikouri<sup>1</sup>, Abdellah Essaid El Feydi<sup>2</sup>, Mustapha Benazzouz<sup>2</sup>,  
Rajaa Afifi<sup>2</sup>, Ama Gassama Diagne<sup>3</sup>, Aziz Benjouad<sup>4</sup>, Anne Dejean<sup>5</sup>, Pascal Pineau<sup>5</sup>,  
Soumaya Benjelloun<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Viral Hepatitis Laboratory, Institut Pasteur du Maroc, Casablanca, Morocco.

<sup>2</sup>Service de Médecine C, CHU Ibn-Sina, Rabat, Morocco.

<sup>3</sup>INSERM, Unité 785, Villejuif, F-94800, Université Paris Sud 11, France.

<sup>4</sup>Laboratoire de Biochimie et d'Immunologie, Université Mohammed V, Rabat,  
Morocco.

<sup>5</sup>Unité d'Organisation Nucléaire et Oncogénèse, INSERM U993, Institut Pasteur de  
Paris, Paris, France.

\*Correspondence should be addressed to: Dr. Soumaya Benjelloun; Viral Hepatitis  
Laboratory, Institut Pasteur du Maroc, 1, Place Louis Pasteur, 20360 Casablanca,  
Morocco. Tél : +212 5 22434470; Fax: +212 5 22260957; E.mail:  
[soumaya.benjelloun@pasteur.ma](mailto:soumaya.benjelloun@pasteur.ma)

## **RESULTATS ET DISCUSSIONS**

### **Abstract**

**Background and Aims:** Hepatocellular carcinoma (HCC) is a common cause of death by cancer worldwide. In Morocco, HCC is characterized by few mutations and a mild chromosome instability suggesting that epigenetic changes may represent the driving force of tumorigenesis in the region. Recently, three studies looked for an association between *EP300* or *PCAF* polymorphisms and cancer but there is a conspicuous lack of data regarding these histone acetyltransferases (HAT) variants and HCC development. The aim of the current study was to assess the impact of the Ile997Val in *EP300* and Asn386Ser in *PCAF* polymorphisms on the risk of HCC.

**Materials and Methods:** We performed a case-control study comparing 94 cases with HCC and 220 matching controls. Sequencing methods were used to determine the genotype at the Ile997Val and Asn386Ser on *EP300* and *PCAF*.

**Results:** We found an overall association between genotypes Val/Val in *EP300* and HCC risk (OR, 3.03; 95% CI, 1.08-8.47; P= 0.028). Population stratifications revealed a trend or significantly higher risks of HCC development for women and HCV-negative patients carrying the *EP300* Val/Val genotype (OR= 4.06; 95% CI, 0.71-23.36; P=0.09 and 4.48; 95% CI, 1.04-19.14, P= 0.02, respectively). The *PCAF* Ser/Ser genotype at codon 386 was more frequent in HCC cases than in control group (P = 0.03). We observed trends for higher risk of HCC among men and/or HCV-negative patients carrying Ser/Ser genotype when compared with controls (OR= 10.62; 95% CI, 0.50-225.13 and 11.78; 95% CI, 0.47-295.56, respectively).

**Conclusion:** It appears that variants of the transcriptional coactivator genes (*EP300* and *PCAF*) may influence HCC risk in populations with low mutations or chromosomal instability rates. Additional surveys are warranted to confirm this first report.

## RESULTATS ET DISCUSSIONS

Key words: *EP300*, *PCAF*, liver cancer, Genetic susceptibility, histone acetyltransferases

### **Introduction**

Primary liver cancer is the fifth most common cancer worldwide and the third most common cause of cancer mortality [1]. Hepatocellular carcinoma (HCC) accounts for 85-90% of all primary liver cancers. There are marked geographic variations in the distribution of HCC, with most cases occurring either in sub-Saharan Africa or in eastern Asia. Racial and ethnic variations in incidence were observed even within the same geographic region [2]. The aetiology of HCC is, thus, heterogeneous and complex. The principal risk factors include chronic infection with hepatitis B and C (HBV and HCV) viruses, dietary exposure to aflatoxin B1 (AFB1), heavy alcohol consumption and cirrhosis of any cause, as well as inherited metabolic diseases [2]. Although many individuals are exposed to these risk factors, HCC develops only in a small group of exposed people, implying that genetic and epigenetic factors might contribute to the carcinogenic mechanism, and that complex interactions between many genetic and environmental factors might be the major cause of HCC.

The adenoviral E1A-binding protein (EP300 or p300) is a transcriptional coactivator that has been implicated in a number of diverse biological functions [3,4]. As a histone acetyltransferase (HAT) [5,6], it regulates transcription via chromatin remodeling [7]. This gene plays an important role in cell proliferation and differentiation as well [8,9]. Thus, it functions as a transcriptional coactivator of nuclear hormone receptors, such as the estrogen receptors [10] and Peroxisome Proliferator-activated Receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) [11], and other DNA binding proteins, such as transcription factors and components of the RNA polymerase II holoenzyme complex [12,13]. A further important role of EP300 is the modulation of p53 pathway at multiple levels; it contributes to maintaining p53 stability by regulating its ubiquitination and degradation, through both mdm2-dependent and -

## RESULTATS ET DISCUSSIONS

independent mechanisms [14,15]. Furthermore, EP300 is required for p53-mediated transactivation of target genes through its coactivator function and acetylation of histones [16-18]. Moreover, it is implicated in the transcriptional regulation of p16INK4a and in the control of the cell cycle [19]. EP300 is located on chromosome 22q13.2 arm, which exhibits frequent loss of heterozygosity in a variety of malignancies including HCC. EP300 contains a G-to-A transition polymorphism in the coding sequence which changes the amino acid codon at 997 position from Isoleucine (Ile) to Valine (Val) (reference SNP rs20551), codon 997 maps closely upstream of the bromodomain responsible of HAT activity and in a region of interaction with JMY, a cofactor known to increase p53-dependent transcription and apoptosis [20].

*P/CAF* (p300/CBP Associating Factor or *KAT2B*) was originally identified as a p300/CBP-binding protein due to its sequence similarity to the yeast GCN5 (yGCN5) [21]. Relevant to PCAF function is the fact that it binds to the same site on p300/CBP as does adenoviral oncoprotein E1A, and competition between these two proteins was observed [8]. Interestingly, transfected PCAF and E1A had opposite effects on cell cycle regulation, suggesting that PCAF has a role in inhibiting cell cycle progression and that E1A is mitogenic activity may occur by disrupting the interaction between PCAF and p300/CBP [8]. Furthermore, the role of PCAF in transcription has been investigated by multiple studies, and its requirement as a HAT and coactivator has been described for myogenesis [22], nuclear receptor mediated [23,24], and growth factor-signaled [25] activation, among other processes. It also may have a role in DNA damage response and apoptosis due to its ability to acetylate p53, E2F1, and Ku70 [26-28] Although P/CAF is a nuclear protein, its nuclear localization was reported to change in response to intra- or extracellular signals [29,30]. In summary PCAF was identified via its ability to interact with p300/CBP and, importantly, the association between p300/CBP and PCAF is required for transcriptional

## **RESULTATS ET DISCUSSIONS**

activation of many genes [21,31]. EP300 and PCAF are, thus, genes with a strong biological relevance for carcinogenesis, which makes them good candidates as HCC susceptibility genes. In previous studies, we have reported that several polymorphisms are associated with an increased risk of HCC in Moroccan population [32-36]. In North-Africa, however, chromosome instability in HCC is mild, suggesting that epigenetic alterations may be the primary mechanism driving liver tumorigenesis [37]. To our knowledge, two association studies about Ile997Val EP300 polymorphism in breast cancer are available [38,39]. These previous works yielded conflicting results as a lack association between Ile997Val EP300 and sporadic breast cancer was found in a series of European patients whereas a protective role of valine variant was detected in an American series of estrogen-positive tumors. No report explored, however, this coding SNP in HCC. Finally, a preliminary analysis reporting Asn386Ser PCAF genotyping on 74 gliomas and 31 controls was published by a Japanese group without any significant findings [40]. Based on the important role that histone acetylation play in various tumor process [41,42].

Despite intermediate levels of chronic hepatitis B and C in the general population (2 and 1% respectively) in Morocco, liver cancer incidence is particularly low in Morocco ( $1.3/10^5$  ASR, according to Globocan 2008). We wonder whether epigenetic changes affecting Moroccan patients could differ qualitatively from what is commonly observed in countries with higher incidence of liver cancer. We hypothesized that polymorphisms in these genes may influence the susceptibility to HCC. To test this hypothesis, we investigated the potential association between Ile997Val and Asn386Ser polymorphisms and the risk of HCC in Moroccan population.

## **RESULTATS ET DISCUSSIONS**

### **Materials and methods**

#### ***Study population***

This case-control study included 94 patients with HCC and 220 cancer-free controls as described previously [35]. Briefly, the cases were recruited from Hospital University Center Ibn-Sina, Sservice of Medicine C, Rabat. For each patient, pathological diagnostics were established by haematoxyllin-eosin staining. All subjects were recruited in Western-Central Morocco (Rabat and Casablanca) in a population of mixed berberic and arabic ethnicity. Each patient was matched for sex and age ( $\pm 5$  years) with at least two controls. The control populations consisted in two subsets of individuals never previously diagnosed with any type of cancer. The first subset was formed with 161 healthy subjects devoid of any liver disease recruited at the Pasteur institute. A second subset of 58 subjects with HCV infection but without HCC were added to control group. (The severity of liver disease was routinely assessed by non-invasive methods. Controls were graded as “low” grade when abdominal ultrasonographic examination confirmed the presence of a mild liver disease concomitant to moderately elevated plasma liver enzymes. Before inclusion, the procedures and purposes of the study were explained to all the subjects. After informed consent was obtained, each participant was interviewed, and a structured questionnaire exploring demographic features and selected risk factors was filled out by interviewers. These investigations, respectful of the declaration of Helsinki, were approved by the Ethics Committee of the Faculté de Medicine of Casablanca.

Serological markers for hepatitis viruses were tested with commercially available kits (AxSYM, Abbott Diagnostics, Germany). Hepatitis B virus surface antigen (HBsAg), Hepatitis B early antigen (HBeAg), anti-HBe, anti-HBc IgG, anti-HBsAg and anti-hepatitis C virus (anti-HCV) were searched for HCC patients whereas HBsAg and Anti-HCV were tested in control subjects.

## **RESULTATS ET DISCUSSIONS**

### ***Genotyping***

EP300 and PCAF were analyzed for SNPs using direct sequencing. SNPs in EP300 and PCAF were derived from the NCBI (SNP database), all the primers were designed by the DNA strider system. PCR was carried out in a final volume of 25µl, containing 50ng of genomic DNA, 20pmol/µl of each primer, 0.5U of Taq DNA polymerase (Invitrogen, France), 200µM of each dNTP and 1.5mM MgCl<sub>2</sub>. A step-down amplification was performed at annealing temperature of 52°C for analysis of Ile997Val of EP300 using a primer pair (forward 5'- TTTCCCAGCCAGCTGTAAGC -3', reverse 5'- CATGCAAAATCTATGCCATG -3' and PCAF Asn386Ser polymorphism was amplified with primers 5'- TGATGCCTTGTGGCTTATGT-3' and 5'- GGAGCTCCTGGAGCAAGTCA-3'. For the negative control, molecular biology water was used instead of template DNA in the reaction system in each panel of PCR reactions. PCR products were purified by using the Exonuclease I/Shrimp Alkaline Phosphatase (GE Healthcare) and sequenced using Big Dye Terminator version 3.1 kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) and run on an ABI automated fluorescent 3130 DNA sequencer. Sequencing data were analyzed using SeqScape v2.5 software (Applied Biosystems). The SNP assays were validated by re-sequencing of 15% of all samples.

### ***Predicting the Effect of Missense SNPs on Protein Function using Hidden Markov Model***

We used the PANTHER/LIB Hidden Markov Model [43] as a statistical method to predict the functional consequence of *EP300* Ile997Val and *PCAF* Asn386Ser polymorphisms. We can then score the likelihood of a single amino acid at a particular position (amino acid PSEC or aaPSEC). When aaPSEC = 0, this is the evolutionarily most common allele (inferred to be definitely functional), whereas more negative values of aaPSEC indicate that the allele is less likely to be observed across evolution (inferred to be less likely to

## **RESULTATS ET DISCUSSIONS**

conserve function). The substitution PEC score is simply the difference between the aaPSEC scores for the two alleles. When subPSEC = 0, the substitution is interpreted as functionally neutral, whereas more negative values of subPSEC predict more deleterious substitutions.

### ***Statistical analysis***

Chi2-test is used to assess whether the genotypes were in Hardy-Weinberg equilibrium and to determine P values for differences in genotype frequencies between cases and controls. The association between the genotypes and the disease were examined by using conditional and unconditional logistic regression to calculate odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (CIs). All ORs were adjusted for age, sex and HCV infection, where it was appropriate. We tested the null hypotheses of multiplicative gene-gene interaction and evaluated departures from multiplicative joint effect models by including main effect variables and their product terms in the logistic regression model. All statistical tests were two-sided and a P-value of less than 0.05 was used as the criterion of statistical significance.

### **Results**

Overall, 94 HCC cases and their 220 controls were analyzed for Ile997Val in *EP300* and Asn386Ser in *PCAF* polymorphisms. The general characteristics of the cases and controls are shown in table 1. No significant differences were found in the distributions of age and sex between cases and controls, which suggest adequate matching based on these variables. Chronic hepatitis C was the main risk factor in the population studied as HCV-targeted antibodies were present in 56.2% of the cases. HBV surface antigen was present in 15.9% of cases. For 15% of the samples, sequencing was repeated for quality control. The results of re-sequencing were 100% concordant with the initial screening.



## **RESULTATS ET DISCUSSIONS**

The frequency of the polymorphism resulting Ile997Val substitution in the *EP300* among controls and cases are shown in table 1. The genotype distribution in controls was in Hardy-Weinberg equilibrium ( $P= 0.635$ ) but not in the cases ( $P= 0.002$ ). The frequencies of the three genotypes were as follows: Ile/Ile 69.1%, Ile/Val 21.3% and Val/Val 9.6% in HCC cases and Ile/Ile 69.5%, Ile/Val 27.3% and Val/Val 3.2% in controls respectively. Based on these data, the frequencies for Ile and Val alleles were 79.8% and 20.2% in HCC cases vs. 83.2% and 16.8% in controls, respectively. Subjects with Val/Val genotype had a 3-fold increase risk for HCC development (OR= 3.026, 95% CI = 1.081-8.473,  $P= 0.028$ ). Under the recessive model of inheritance, the Val/Val genotype was associated with an increased risk for HCC with an odds ratio higher than dominant model (adjusted OR= 3.184, 95% CI = 1.189-8.523,  $P= 0.026$  vs. OR= 1.019, 95% CI = 0.604-1.720,  $P= 0.944$ , respectively), after adjustment for age and viruses infections in the multivariate logistic regression analysis (Table 1).

The Ile997Val *EP300* genotype distributions in the HCC patients and controls stratified by HCV infection and gender status are shown in Figure 1 and Table 2. There was no significant correlation between HCC and Ile997Val when HCV-positive cases and HCV-positive controls were compared ( $P = 0.479$ ). However, there was an overall significant difference in genotype distribution between HCV-negative cases and HCV negative controls ( $P = 0.029$ ). HCV-negative patients who were homozygotes for the Val allele had a 4-fold increase in risk for development of HCC (OR= 4.480, 95% CI = 1.049-19.140) (Figure 1). Subgroup analysis revealed that the effect was potentially higher among women than men. Indeed, Val/Val carrying female patients had a non significant odds ratio of 4 ( $P=0.09$ , Table 2).

We analyzed the *PCAF* Asn386Ser polymorphism in HCC cases and controls by sequencing. The genotype and allele distribution of the Asn386Ser polymorphism are

## **RESULTATS ET DISCUSSIONS**

shown in Table 1. The distributions of the *PCAF* Asn386Ser genotype among the controls were in Hardy-Weinberg equilibrium ( $P= 1.00$ ). The genotype frequencies were 88.2% (Asn/Asn), 11.8% (Asn/Ser) and 0% (Ser/Ser), respectively, among the controls, which were significantly different from those of HCC (93.6% Asn/Asn, 4.3% Asn/Ser and 2.1% Ser/Ser). The Ser/Ser genotype was more frequent in the HCC cases than in controls (2.1% vs. 0%,  $P= 0.037$ ). Multivariate logistic regression analyses revealed that compared with the Asn/Asn genotype, the ORs for HCC patients carrying the Asn/Ser, Ser/Ser and Asn/Ser + Ser/Ser genotypes were 0.339 (95% CI, 0.115-1.001), 10.989 (95% CI, 0.522-231.276) and 1.02 (95% CI, 0.61-1.69), respectively. The *PCAF* Asn386Ser genotype distributions in HCC cases and controls stratified by HCV infection status and gender are shown in Figure 1 and Table 2. Ser/Ser genotype carriers without HCV infection display a strong trend toward an increased risk of HCC (OR=11.7, 0.470-295.560, NS, Table 3). Similarly, gender analysis revealed that the impact of Ser/Ser polymorphism was stronger among men. The odds ratio for HCC risk was 10.62 (95% CI, 0.500-225.130) compared with Asn/Asn-carrying male patients.

Gene-gene interactions between the *EP300* and *PCAF* polymorphisms were examined (Table 3). We found that the patients carrying the *EP300* Val/Val genotype were also more frequently carrying the *PCAF* Asn/Ser genotype than the controls (3.19 versus 0%,  $P= 0.012$ ). Adjusted ORs (95% CI) for the presence of HCC were obtained by logistic regression. Both Val/Val/Asn/Ser and Ile/Ile/Ser/Ser combinations were associated with a higher, albeit non significant, risk of HCC (adjusted OR = 14.84, 95% CI, 0.761-293.894 and OR = 10.68, 95% CI, 0.500-225.780, respectively). These results indicate a possible joint effect between the *EP300* Ile/Ile and *PCAF* Ser/Ser genotype and *EP300* Val/Val and *PCAF* Asn/Ser genotype in intensifying the risk of developing HCC.

## **RESULTATS ET DISCUSSIONS**

Trying to predict the functional consequence of *EP300* Ile997Val and *PCAF* Asn386Ser polymorphisms using PANTHER/LIB HMMs [43], we found that the Asn to Ser change in PCAF protein may possibly be a functional SNP (subPSEC = -4.52) by changing a medium size polar residue for a small one. By contrast, the Ile to Val change in EP300 protein was apparently not deleterious (subPSEC = -1.83) as both residues were medium size and hydrophobic. This result, in apparent contradiction with the pathogenic role of each variant in HCC, indicates that HMM may be used with caution and should be modulated by clinical observations.

### **Discussion**

The input of germline variations in HCC etiology and most other cancers remains unclear and it has been hypothesized that common genetic variants (low penetrance genes) with modest but cumulative effects on disease susceptibility cause the bulk of unexplained risk [44]. It has been demonstrated that SNPs altering primary sequences of proteins can affect the functions of proteins and in turn influence the individual susceptibility to cancers [45]. EP300 and PCAF are genes with a strong biological relevance for carcinogenesis, which makes them potential candidates as HCC susceptibility genes. We found that the frequency of Val/Val genotype at the position 997 in EP300 gene significantly higher in HCC patients compared with controls. This result suggested that the presence of Val/Val genotype at position 997 in *EP300* gene was likely to be associated with the development of HCC. By contrast, previous studies reporting about the role of *EP300* Ile997Val in familial and sporadic breast cancers have different outcomes [38,39]. One of these studies reported a protective role for Ile997Val in estrogen receptor-positive breast cancer whereas no effect was detected in a European series of sporadic breast cancers [38,39]. Cancer histotypes as well as ethnic and/or environmental differences may plausibly explain these conflicting results. Curiously, the association between the Ile997Val genotypes and the risk

## **RESULTATS ET DISCUSSIONS**

of HCC examined after stratification according to gender revealed that the effect of the *EP300* variant on HCC development was, albeit without reaching the significant threshold, potentially much higher in women than men. Indeed, women patients, carrying Val/Val genotype, had odds ratio of 4. This preliminary finding deserves of course further investigation to be statistically validated but it suggests that chromatin remodeling complex (incl. HAT proteins) composition and/or activity may widely differ from a diseased tissue to another. More importantly, we found that patients codon997 Ile/Ile carriers non-infected with HCV are at increased risk to develop primary liver cancer (OR=4.48) when compared with patients infected with the virus (OR=1.71). It is well known that HCV-induced liver tumorigenesis relies on continuous inflammation/cytokines pathway activation [46]. Our data suggest, that in absence of hepatitis C, liver tumorigenesis may follow an utterly different process depending on germline alterations affecting chromatin remodeling apparatus.

To our knowledge, a single study examined the *PCAF* Asn386Ser polymorphism in cancer. In a limited cohort of Japanese gliomas and controls, Nishimori and coworkers did not detect any significant difference [40]. In the present study we found that the frequency of the Ser/Ser genotype, although still rather low, was significantly higher in HCC patients than controls (2.1% vs. 0%;  $P=0.037$ ). Amazingly, the frequency of the heterozygous form decreased in HCC patients with regard to controls (4.2% vs. 11.8,  $P=0.041$ ). When we carried out subgroups analyses (i.e. genders and presence/absence of HCV), we obtain similar results. More specifically, male patients and patients uninfected with HCV display a trend to be at increased risk of HCC when compared with women or patients with hepatitis C. However, in each case, confidence interval was indicating that random variations in populations could explain the differences observed. These inconsistent results

## **RESULTATS ET DISCUSSIONS**

indicate merely that a substantial increase in the power of future genetic studies is necessary to get solid conclusions.

In conclusion, we found that the Val/Val of the *EP300* at codon 997 and Ser/Ser of the *PCAF* at codon 386 were associated with an increased risk of HCC in the Moroccan population. A higher risk of HCC was observed in HCV-negative subjects. We also found that male with Ser/Ser in the *PCAF* gene and women with Val/Val genotype of the *EP300* had a higher risk to develop HCC. The potential association of HATs polymorphisms with the sex of the patients represents an interesting molecular clue. It is well known that HATs participate with nuclear hormone receptors to the functioning of the Nuclear Coactivator complex (NCoA) to control the expression of many involved in proliferation and differentiation. Our findings represent, thus, a rationale to explore the activity of NCoA complex loaded with different variants of HATs. We are, however, fully aware that some aspects clearly warrant further investigations. In summary, future analyses of above mentioned and additional polymorphisms and haplotypes in histone acetylation genes within large pooled studies will help to clarify their role in hepatocarcinogenesis and may provide a mechanism for the relationship between histone acetylation and HCC.

### **Acknowledgements**

The authors would like to acknowledge all patients for their participation in this study. This work was supported by Pasteur Institute of Morocco and the Pasteur Institutes International Network (RIIP).

### **Financial disclosure**

The authors who have taken part in this study declared that they do not have any financial disclosure or conflict of interest with respect to this manuscript.

## **RESULTATS ET DISCUSSIONS**

### **References**

1. Parkin DM. Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol*2001;2(9):533- 543.
2. McGlynn KA, London WT. Epidemiology and natural history of hepatocellular carcinoma. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*2005; 19(1):3-23.
3. Eckner R, Ewen ME, Newsome D, Gerdes M, DeCaprio JA, Lawrence JB, et al. Molecular cloning and functional analysis of the adenovirus E1A-associated 300-kD protein (p300) reveals a protein with properties of a transcriptional adaptor. *Genes Dev*1994;8(8):869-884.
4. Giordano A, Avantiaggiati ML. p300 and CBP: partners for life and death. *J Cell Physiol*1999;181(2):218-230.
5. Bannister AJ, Kouzarides T. The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature*1996;384(6610):641-643.
6. Ogryzko VV, Schiltz RL, Russanova V, Howard BH, Nakatani Y. The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell*1996;87(5):953-959.
7. Grunstein M. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature*1997;389(6649):349-352.
8. Kawasaki H, Eckner R, Yao TP, Taira K, Chiu R, Livingston DM, et al. Distinct roles of the co-activators p300 and CBP in retinoic-acid-induced F9-cell differentiation. *Nature*1998;393(6682):284-289.
9. Yao TP, Oh SP, Fuchs M, Zhou ND, Ch'ng LE, Newsome D, et al. Gene dosage-dependent embryonic development and proliferation defects in mice lacking the transcriptional integrator p300. *Cell*1998;93(3):361-372.
10. Hanstein B, Eckner R, DiRenzo J, Halachmi S, Liu H, Searcy B, et al. p300 is a component of an estrogen receptor coactivator complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93(21):11540-11545.
11. Camp HS, Li O, Wise SC, Hong YH, Frankowski CL, Shen X, et al. Differential activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma by troglitazone and rosiglitazone. *Diabetes*2000;49(4):539-547.
12. Jacobson S, Pillus L. Modifying chromatin and concepts of cancer. *Curr Opin Genet Dev*1999;9(2):175-184.
13. Kouzarides T. Histone acetylases and deacetylases in cell proliferation. *Curr Opin Genet Dev*1999;9(1):40-48.
14. Grossman SR, Deato ME, Brignone C, Chan HM, Kung AL, Tagami H, et al. Polyubiquitination of p53 by a ubiquitin ligase activity of p300. *Science*2003;300(5617):342-344.
15. Grossman SR, Perez M, Kung AL, Joseph M, Mansur C, Xiao ZX, et al. p300/MDM2 complexes participate in MDM2-mediated p53 degradation. *Mol Cell*1998;2(4):405-415.
16. Avantiaggiati ML, Ogryzko V, Gardner K, Giordano A, Levine AS, Kelly K. Recruitment of p300/CBP in p53-dependent signal pathways. *Cell*1997;89(7):1175-1184.
17. Espinosa JM, Emerson BM. Transcriptional regulation by p53 through intrinsic DNA/chromatin binding and site-directed cofactor recruitment. *Mol Cell*2001;8(1):57-69.
18. Lill NL, Grossman SR, Ginsberg D, DeCaprio J, Livingston DM. Binding and modulation of p53 by p300/CBP coactivators. *Nature*1997;387(6635):823-827.
19. Wang X, Pan L, Feng Y, Wang Y, Han Q, Han L, et al. P300 plays a role in p16(INK4a) expression and cell cycle arrest. *Oncogene*2008;27(13):1894-1904.
20. Coutts AS, La Thangue NB. The p53 response: emerging levels of co-factor complexity. *Biochem Biophys Res Commun*2005;331(3):778-785.

## **RESULTATS ET DISCUSSIONS**

21. Yang XJ, Ogryzko VV, Nishikawa J, Howard BH, Nakatani Y. A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. *Nature* 1996;382(6589):319-324.
22. Puri PL, Sartorelli V, Yang XJ, Hamamori Y, Ogryzko VV, Howard BH, et al. Differential roles of p300 and PCAF acetyltransferases in muscle differentiation. *Mol Cell* 1997;1(1):35-45.
23. Blanco JC, Minucci S, Lu J, Yang XJ, Walker KK, Chen H, et al. The histone acetylase PCAF is a nuclear receptor coactivator. *Genes Dev* 1998;12(11):1638-1651.
24. Korzus E, Torchia J, Rose DW, Xu L, Kurokawa R, McInerney EM, et al. Transcription factor-specific requirements for coactivators and their acetyltransferase functions. *Science* 1998;279(5351):703-707.
25. Xu L, Lavinsky RM, Dasen JS, Flynn SE, McInerney EM, Mullen TM, et al. Signal-specific co-activator domain requirements for Pit-1 activation. *Nature* 1998;395(6699):301-306.
26. Chao C, Wu Z, Mazur SJ, Borges H, Rossi M, Lin T, et al. Acetylation of mouse p53 at lysine 317 negatively regulates p53 apoptotic activities after DNA damage. *Mol Cell Biol* 2006;26(18):6859-6869.
27. Cohen HY, Lavu S, Bitterman KJ, Hekking B, Imahiyerobo TA, Miller C, et al. Acetylation of the C terminus of Ku70 by CBP and PCAF controls Bax-mediated apoptosis. *Mol Cell* 2004;13(5):627-638.
28. Martinez-Balbas MA, Bauer UM, Nielsen SJ, Brehm A, Kouzarides T. Regulation of E2F1 activity by acetylation. *Embo J* 2000;19(4):662-671.
29. Gregoire S, Xiao L, Nie J, Zhang X, Xu M, Li J, et al. Histone deacetylase 3 interacts with and deacetylates myocyte enhancer factor 2. *Mol Cell Biol* 2007;27(4):1280-1295.
30. Wong K, Zhang J, Awasthi S, Sharma A, Rogers L, Matlock EF, et al. Nerve growth factor receptor signaling induces histone acetyltransferase domain-dependent nuclear translocation of p300/CREB-binding protein-associated factor and hGCN5 acetyltransferases. *J Biol Chem* 2004;279(53):55667-55674.
31. Chen H, Lin RJ, Schiltz RL, Chakravarti D, Nash A, Nagy L, et al. Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300. *Cell* 1997;90(3):569-580.
32. Ezzikouri S, El Feydi AE, Afifi R, Benazzouz M, Hassar M, Pineau P, et al. Polymorphisms in antioxidant defence genes and susceptibility to hepatocellular carcinoma in a Moroccan population. *Free Radic Res* 2010;44(2):208-216.
33. Ezzikouri S, El Feydi AE, Afifi R, El Kihal L, Benazzouz M, Hassar M, et al. MDM2 SNP309T>G polymorphism and risk of hepatocellular carcinoma: A case-control analysis in a Moroccan population. *Cancer Detect Prev* 2009;32(5-6):380-385.
34. Ezzikouri S, El Feydi AE, Benazzouz M, Afifi R, El Kihal L, Hassar M, et al. Single nucleotide polymorphism in DNMT3B promoter and its association with hepatocellular carcinoma in a Moroccan population. *Infect Genet Evol* 2009.
35. Ezzikouri S, El Feydi AE, Chafik A, Afifi R, El Kihal L, Benazzouz M, et al. Genetic polymorphism in the manganese superoxide dismutase gene is associated with an increased risk for hepatocellular carcinoma in HCV-infected Moroccan patients. *Mutat Res* 2008;649(1-2):1-6.
36. Ezzikouri S, El Feydi AE, Chafik A, Benazzouz M, El Kihal L, Afifi R, et al. The Pro variant of the p53 codon 72 polymorphism is associated with hepatocellular carcinoma in Moroccan population. *Hepatol Res* 2007;37(9):748-754.
37. Pineau P, Ezzikouri S, Marchio A, Benazzouz M, Cordina E, Afifi R, et al. Genomic stability prevails in North-African hepatocellular carcinomas. *Dig Liver Dis* 2007;39(7):671-677.



## **RESULTATS ET DISCUSSIONS**

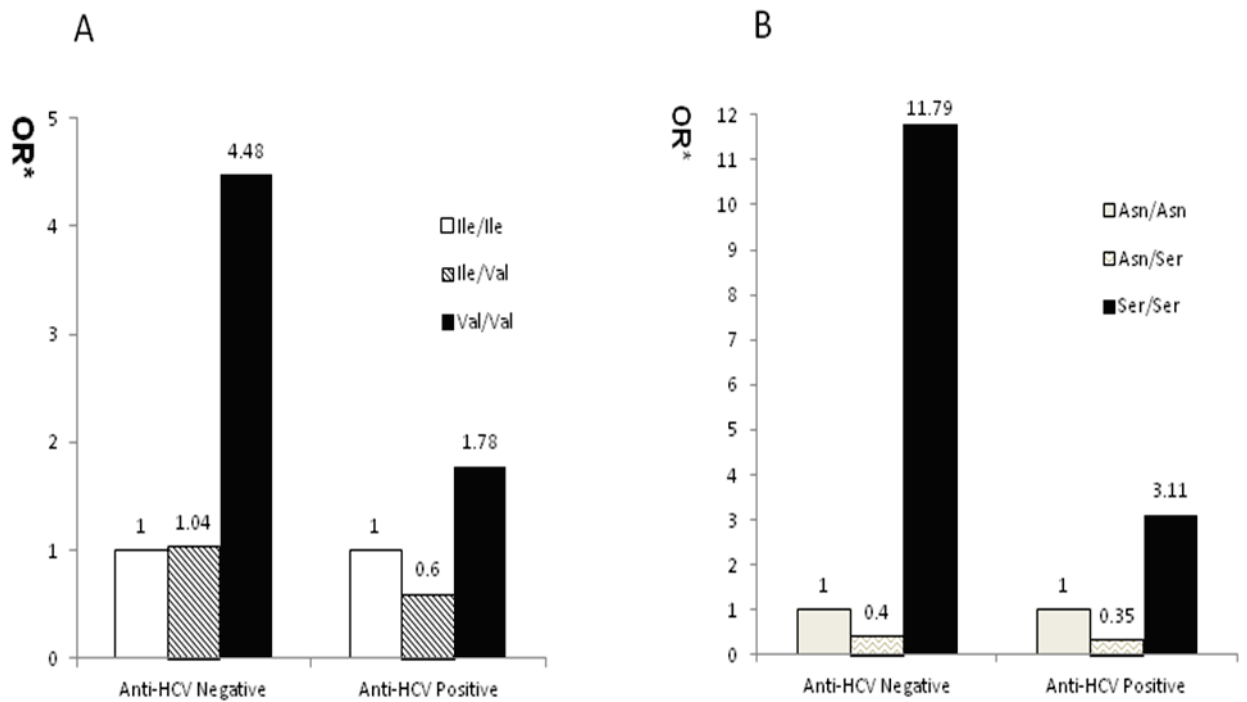
- 38.Haiman CA, Garcia RR, Hsu C, Xia L, Ha H, Sheng X, et al. Screening and association testing of common coding variation in steroid hormone receptor co-activator and co-repressor genes in relation to breast cancer risk: the Multiethnic Cohort. *BMC Cancer*2009;9(43).
- 39.Wirtenberger M, Tchatchou S, Hemminki K, Schmutzhard J, Sutter C, Schmutzler RK, et al. Associations of genetic variants in the estrogen receptor coactivators PPARGC1A, PPARGC1B and EP300 with familial breast cancer. *Carcinogenesis*2006;27(11):2201-2208.
- 40.Nishimori H, Nishikawa R, Fujimaki T, Nakagomi T, Matsutani M, Huang HJ, et al. Analysis of the p300/CBP-Associated Factor (PCAF) gene in astrocytic tumors. *J Neurooncol*2000;46(1):17-22.
- 41.Kurdistani SK. Histone modifications in cancer biology and prognosis. *Prog Drug Res*2010;67(91-106).
- 42.Sawan C.Herceg Z. Histone modifications and cancer. *Adv Genet*2010;70(57-85).
- 43.Thomas PD, Campbell MJ, Kejariwal A, Mi H, Karlak B, Daverman R, et al. PANTHER: a library of protein families and subfamilies indexed by function. *Genome Res*2003;13(9):2129-2141.
- 44.Zondervan KT.Cardon LR. The complex interplay among factors that influence allelic association. *Nat Rev Genet*2004;5(2):89-100.
- 45.Robert J. Gene polymorphisms. *Bull cancer*2010;97(11):1253-1264.
- 46.Castello G, Scala S, Palmieri G, Curley SA, Izzo F. HCV-related hepatocellular carcinoma: From chronic inflammation to cancer. *Clin Immunol*2010;134(3):237-250



## RESULTATS ET DISCUSSIONS

**Figure 1:** *EP300* Ile997Val and *PCAF* Asn386Ser genotypes and associated odds ratio according to HCV infection statut. (A) Distribution of Ile997Val genotypes and associated odds ratio in HCV infection. (B) Distribution of Asn386Ser genotypes and HCV infection

\*Adjusted for age, HBV and sex



## RESULTATS ET DISCUSSIONS

**Table 1: Characteristics and Association between EP300 Ile997Val and PCAFAsn386Ser Polymorphisms and risk of Hepatocellular Carcinoma**

|                               | HCC patients,<br>(N = 94) | Controls,<br>(N = 220) | OR (95% CI) <sup>†</sup> | P-value |
|-------------------------------|---------------------------|------------------------|--------------------------|---------|
| Age (mean ± SD years)         | 60.37 ± 12.68             | 56.67 ± 9.45           |                          | 0.578   |
| Sex ratio (Male/Female)       | 1.35                      | 1.36                   |                          | 1.000   |
| HBsAg Positive                | 15 (15.9%)                | 7 (3.2%)               |                          | 0.001   |
| Anti-HCV Positive             | 55 (56.2%)                | 59 (27.7%)*            |                          | 0.0001  |
| Hepatitis B and C             | 5 (5.1%)                  | 1 (0.4%)               |                          | 0.011   |
| Alcoholic                     | 3 (3.1%)                  | 3 (1.3%)               |                          | 0.375   |
| NIDDM**                       | 8 (8.2%)                  | 3 (1.3%)               |                          | 0.004   |
| <b><i>EP300 Ile997Val</i></b> |                           |                        |                          |         |
| Ile/Ile                       | 65 (69.1)                 | 153 (69.5)             | 1.00                     |         |
| Ile/Val                       | 20 (21.3)                 | 60 (27.3)              | 0.78 (0.44-1.41)         | 0.414   |
| Val/Val                       | 9 (9.6)                   | 7 (3.2)                | 3.03 (1.08-8.47)         | 0.028   |
| Allelic Frequency             |                           |                        |                          |         |
| Ile                           | 0.798 ± 0.0339            | 0.832 ± 0.0181         | 1.00                     |         |
| Val                           | 0.202 ± 0.0339            | 0.168 ± 0.0181         | 1.25 (0.81-1.94)         | 0.309   |
| <b><i>PACFAsn386Ser</i></b>   |                           |                        |                          |         |
| Asn/Asn                       | 88 (93.6)                 | 194 (88.2)             | 1.00                     |         |
| Asn/Ser                       | 4 (4.3)                   | 26 (11.8)              | 0.34 (0.11-1.00)         | 0.041   |
| Ser/Ser                       | 2 (2.1)                   | 0 (0)                  | 10.99 (0.52-231.28)      | 0.037   |
| Allelic Frequency             |                           |                        |                          |         |
| Asn                           | 0.957 ± 0.017             | 0.941 ± 0.010          | 1.00                     |         |
| Ser                           | 0.043 ± 0.017             | 0.059 ± 0.010          | 0.708 (0.314-1.593)      | 0.401   |

\*: The prevalence of anti-HCV antibodies in only 1.2% when we consider only the subset of healthy individuals (n=2/161, p<0.0001)

\*\*Non-insulin-dependent diabetes mellitus

<sup>†</sup>Multivariate analysis adjusted for age, sex, HBV and HCV infection.

## RESULTATS ET DISCUSSIONS

**Table 2: Distribution of *EP300* Ile997Val and *PCAF* Asn386Ser genotypes and associated odds ratio in relation to sex**

| Gender                        | Genotype | HCC n (%) | Controls n (%) | OR (95% CI)*        | P-value |
|-------------------------------|----------|-----------|----------------|---------------------|---------|
| <b><i>EP300</i> Ile997Val</b> |          |           |                |                     |         |
| <i>Male</i>                   | Ile/Ile  | 33 (35.1) | 88 (40)        | 1.00                | 0.534   |
|                               | Ile/Val  | 16 (17)   | 34 (15.5)      | 1.25 (0.61-2.57)    |         |
|                               | Val/Val  | 5 (5.3)   | 5 (2.3)        | 2.67 (0.72-9.81)    |         |
| <i>Female</i>                 | Ile/Ile  | 32 (34)   | 65 (29.5)      | 1.00                | 0.037   |
|                               | Ile/Val  | 4 (4.3)   | 26 (11.8)      | 0.31 (0.10-0.97)    |         |
|                               | Val/Va   | 4 (4.3)   | 2 (0.9)        | 4.06 (0.71-23.36)   |         |
| <b><i>PCAF</i> Asn386Ser</b>  |          |           |                |                     |         |
| <i>Male</i>                   | Asn/Asn  | 52 (55.3) | 111 (50.4)     | 1.00                | 0.007   |
|                               | Asn/Ser  | 0 (0)     | 16 (7.3)       | 0.06 (0.004-1.09)   |         |
|                               | Ser/Ser  | 2 (2.1)   | 0 (0)          | 10.62 (0.50-225.13) |         |
| <i>Female</i>                 | Asn/Asn  | 36 (38.3) | 83 (37.7)      | 1.00                | 0.896   |
|                               | Asn/Ser  | 4 (4.2)   | 10 (4.5)       | 0.92 (0.271-3.135)  |         |
|                               | Ser/Ser  | 0 (0)     | 0 (0)          | 2.29 (0.04-117.53)  |         |

\*Adjusted for age, HBV and HCV infection

## RESULTATS ET DISCUSSIONS

**Table 3: Risk of HCC for combinations of EP300 and PCAF genotypes**

| <i>EP300</i><br>Ile997Val | <i>PCAF</i><br>Asn386Ser | HCC, n (%) | Controls, n (%) | OR (95% CI)*        | P-value |
|---------------------------|--------------------------|------------|-----------------|---------------------|---------|
| Ile/Ile                   | Asn/Asn                  | 62 (15.30) | 133 (14.41)     | 1.00                |         |
| Ile/Ile                   | Asn/Ser                  | 1 (8.16)   | 20 (17.12)      | 0.11 (0.01-0.82)    | 0.009   |
| Ile/Ile                   | Ser/Ser                  | 2 (1.02)   | 0 (7.14)        | 10.68 (0.50-225.78) | 0.040   |
| Ile/Val                   | Asn/Asn                  | 20 (25.51) | 54 (25.22)      | 0.79 (0.44-1.44)    | 0.448   |
| Ile/Val                   | Asn/Ser                  | 0 (15.31)  | 6 (14.86)       | 0.16 (0.01-2.96)    | 0.096   |
| Ile/Val                   | Ser/Ser                  | 0 (4.08)   | 0 (6.31)        | 2.14 (0.04-108.89)  | 1.000   |
| Val/Val                   | Asn/Asn                  | 6 (12.24)  | 7 (9)           | 1.839 (0.59-5.70)   | 0.285   |
| Val/Val                   | Asn/Ser                  | 3 (3.19)   | 0 (0)           | 14.95 (0.76-293.89) | 0.012   |
| Val/Val                   | Ser/Ser                  | 0 (9.18)   | 0 (2.25)        | 2.14 (0.04-108.89)  | 1.000   |

\*Multivariate analysis adjusted for age, sex, HBV and HCV infection.

## **RESULTATS ET DISCUSSIONS**

### **2. Discussion 1**

Dans notre travail, nous avons étudié la répartition des polymorphismes Asn386Ser du gène pcaf et Ile997Val du gène ep300 dans une population Marocaine de malades ayant un carcinome hépatocellulaire, comparée à une population témoin, saine, afin de tester l'existence d'une association entre ces polymorphismes et le risque de développement du CHC.

Notre échantillon est caractérisé par une légère prédominance d'hommes malades avec un sexe ratio de 1.35 et de patients dont l'âge se situe en moyenne à 60 ans. Une telle fréquence chez des individus âgés constitue un problème majeur de santé publique. Cette augmentation de risque chez ces personnes âgées indique qu'une plus grande exposition à des facteurs environnementaux, favoriserait l'apparition du CHC.

En ce qui concerne l'association des SNPs Val997Val et Ser386Ser au risque de carcinome hépatocellulaire, nos résultats suggèrent que ces variants sont associé à un risque élevé de CHC.

En effet, le polymorphisme Ser386Ser a été testé dans une seule étude réalisée chez des patients japonais atteints de tumeurs gliales [316], sans révéler une association directe de ce polymorphisme avec ce cancer. Notre investigation est la première faisant suspecter l'association de ce SNP avec le carcinome hépatocellulaire.

Dans notre étude, une autre association potentielle entre le SNP Val997Val et le CHC est également observée. Par contre, des études cas témoins avaient révélé des différents résultats concernant l'association de ce polymorphisme avec d'autres cancers [317-318]. Notre étude est donc la première à tester et révéler cette association avec le CHC.

Cette différence dans les résultats entre les études cas-témoins pourrait être dû aux type du cancer en question et la différence ethnique entre les populations d'étude. En effet, la différence dans les prévalences de ces polymorphismes décrites dans des groupes ethniques différents influenceraient la susceptibilité au cancer, probablement par des modifications de l'activité des protéines PCAF et EP300 sur les carcinogènes environnementaux.

Nous montrons que le risque d'apparition du CHC en association avec les polymorphismes Ser386Ser et Val997Val, varie en fonction du sexe. Puisque, pour le SNP Ser386Ser, nous avons trouvé un risque plus élevé chez les hommes que chez les femmes. L'augmentation du risque chez les hommes, observée dans notre travail, s'explique par une prédominance

## **RESULTATS ET DISCUSSIONS**

dans notre population de patients de sexe masculin. Cette hypothèse est accentuée par la légère différence du risque au CHC entre les hommes et les femmes.

Par contre Nous montrons que le risque d'apparition du CHC est nettement augmenté chez les femmes portant le polymorphisme Val997Val. L'augmentation du risque chez les femmes, observée dans notre travail, pourrait être dû à une influence d'ordre hormonale.

En conclusion, EP300 et PCAF sont des Co-activateurs impliquée dans un grand nombre de fonctions biologiques diverses et variées telles que la prolifération cellulaire, la régulation du cycle cellulaire, l'apoptose, la différenciation et la réponse aux dommages de l'ADN [308]. Leur altération totale ou partielle peut conduire à une dérégulation de ces processus favorisant ainsi l'apparition de cancer.

### ***B. Partie II : Rôle de Septine 9, PIAS1, SUMO1 dans la réplication du virus de l'hépatite C***

**Hepatitis C Virus promotes Septin 9 assembly in filament, microtubule organization and lipid droplets accumulation through recruitment of PIAS1.**

Akil Abdallah, Claire Gondeau, Juan Peng, Mickaël Marin, Sokhavuth Sar, Philippe Briolotti, Soumaya Benjelloun, Abdelaziz Benjouad, Patrick Maurel, Didier Samuel, Christian Bréchet and Ama Gassama-Diagne

***Article En cours de soumission***

## **RESULTATS ET DISCUSSIONS**

### **1. Introduction 2**

L'hépatite C chronique reste un facteur de risque majeur associée au développement d'une stéatose et d'une fibrose pouvant conduire à la cirrhose et au carcinome hépatocellulaire (CHC). Malgré l'importance des connaissances accumulées sur le VHC depuis 1989, une fraction importante de patients ne répond pas au traitement antiviral. Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires qui permettent l'établissement et le maintien d'une infection persistante par le VHC devrait permettre le développement de nouvelles stratégies antivirales visant à l'éradication de l'infection virale et la prévention ou la régression des pathologies associées (stéatose, fibrose, CHC).

#### **a. Septine 9, PIAS1, SUMO1 : nouveaux facteurs cellulaires pour la réplication du VHC**

Au cours de travaux précédents mon arrivé à l'unité Inserm U785. L'équipe avait identifié, en utilisant des techniques moléculaires et des expériences d'immunohistochimie, qu'une protéine cellulaire, la septine 9 était surexprimée chez des patients atteints de CHC et chroniquement infectés par le VHC. Cette observation a été confirmée par la suite par des expériences d'immunolocalisation et d'autres expériences dans des cellules hépatocytaires répliquant le VHC. A partir de ces données, notre but était de comprendre le rôle de cette protéine dans la réplication du VHC, pour cela nous avons dans un premier temps co-transfecté des cellules Huh7.5 avec des siRNA septin 9 et de la souche virale JFH1 de génotype 2a. Quelques jours suivant la co-transfection, les lysats cellulaires sont récoltés pour des expériences de QRT PCR et Western Blot, et les cellules sont fixées pour des expériences d'immunofluorescence. En testant la capacité du VHC à se répliquer dans les Huh7.5 avec des siRNA septine 9, nous avons montré que la septine 9 est impliquée dans la réplication du VHC et dans l'expression protéique de la capsid virale. Nous avons aussi testé dans le système réplicon la capacité de la septine 9 à réguler l'expression protéique des protéines virales core et E2. Nous avons montré ainsi que cette protéine est nécessaire à l'expression de ces protéines virales. D'autant plus, nous avons observé que la septine 9 pouvait interagir avec core et E2, confirmant un rôle important de la septine 9 dans les mécanismes de la production de particules virales. Bien que nous avons observé un effet drastique de la septine 9 sur la réplication du VHC. Nos expériences préliminaires ne permettaient pas de savoir à quel moment du cycle viral la septine 9 pouvait intervenir.



## **RESULTATS ET DISCUSSIONS**

Dans ce cadre, nous avons voulu définir les mécanismes par lesquels cette protéine pouvait intervenir. Pour cela nous avons analysé, l'effet de la septine 9 sur la production des gouttelettes lipidiques et leur association avec la protéine de capsid. Nos résultats ont mis en évidence que la septine 9 module la redistribution de GLs et leur association avec la capsid du VHC et contribue à établir l'environnement lipidique nécessaire pour la production virale. La redistribution des GLs au niveau périnucléaire dans les cellules exprimant la capsid virale est dépendante des microtubules. De plus, la perturbation des microtubules réduit la sortie des particules virales. Nos résultats ont montré que le VHC augmente la polymérisation des microtubules, et que ces derniers ont été trouvés en colocalisation avec les filaments de la septine 9. Dans ce cadre, nous avons analysé l'impact de l'extinction individuelle de la septine 9 par ARN d'interférence (siRNA). La déplétion de la septine 9 dans les cellules infectées a changée l'organisation du réseau de microtubules.

Ce travail a également permis d'identifier la protéine PIAS1 et SUMO1 comme régulateurs de l'expression et de l'assemblage de la septine 9 en filaments. Ici nous avons fourni des données intéressantes sur la possible sumoylation de la septine 9 par PIAS1. La déplétion de PIAS1 et SUMO1 par des siRNAs spécifiques diminue l'expression protéique de la septine 9 et désorganise sa structure filamenteuse. Nous avons aussi pu mettre en évidence, l'existence des interactions entre la septine 9 et les protéines PIAS1 et SUMO1.

Finalement, nous proposons que la production de particules virales VHC requière la formation d'un complexe septine 9, PIAS1, SUMO1.

## **RESULTATS ET DISCUSSIONS**

### **Hepatitis C Virus promotes Septin 9 assembly in filament, microtubule organization and lipid droplets accumulation through recruitment of PIAS1.**

Akil Abdallah<sup>1,2,7</sup>, Claire Gondeau<sup>3,4,5</sup>, Juan Peng<sup>1,2</sup>, Mickaël Marin<sup>1,2</sup>, Sokhavuth Sar<sup>1,2</sup>, Philippe Briolotti<sup>3,4,5</sup>, Soumaya Benjelloun<sup>6</sup>, Abdelaziz Benjouad<sup>7</sup>, Patrick Maurel<sup>3,4,5</sup>, Didier Samuel<sup>1,2</sup>, Christian Bréchet<sup>1,2,8</sup> and Ama Gassama-Diagne<sup>\*1,2</sup>

<sup>1</sup> INSERM, Unité 785, Villejuif, F-94800, France

<sup>2</sup> Univ Paris-Sud, UMR-S 785, Villejuif, F-94800, France

<sup>3</sup> INSERM Unité 1040, Montpellier, F-34295, France

<sup>4</sup> Univ Montpellier 1, UFR Medecine, Montpellier, France

<sup>5</sup> Institute of Research in Biotherapy, CHU Montpellier, Hopital Saint Eloi, F-34293 France

<sup>6</sup> Laboratoire des Hépatites Virales, Département de Virologie. Institut Pasteur du Maroc, BP 20360, Casablanca, Maroc.

<sup>7</sup> Université Mohammed V Agdal-Rabat, UFR de Biochimie-Immunologie. Faculté des Sciences Rabat-Agdal, Rabat-Maroc

<sup>8</sup> Institut Merieux, Lyon, F-69000, France

\*Correspondence should be addressed to:

tel: +33 1 45 59 60 70

fax: 0145596090

email : [ama.gassama@inserm.fr](mailto:ama.gassama@inserm.fr)

## **RESULTATS ET DISCUSSIONS**

### **SUMMARY**

Infection by Hepatitis C virus (HCV) is a public health problem and a leading cause of liver cancer. Several host proteins have been proposed to facilitate the replication of HCV however much is needed to elucidate the implicated mechanisms. Here we report that HCV infection increases expression and formation of septin 9 filament surrounding HCV core. PIAS1 (protein inhibitor of activating STAT1) was also enriched in these core clusters. Reciprocally knock down of septin 9 and PIAS1 severely reduced core expression, lipid droplets accumulation and virus replication. Septin 9 assembly in filaments and its effects on lipid droplet and microtubules are dependent of PIAS1. Moreover siRNA of SUMO1 affected septin expression, suggesting that the regulatory function of PIAS1 on septin 9 structure and function might depend on sumoylation. Thus we identified new targets that settle the relationship between HCV and its host cell and opened therapeutic directions.

**KEYWORDS:** HCV, PIAS1, Septin 9, Microtubules, lipid droplets.

**RUNNING TITLE:** Septin 9 and hepatitis C virus replication.

### **INTRODUCTION**

Hepatitis C virus (HCV) replicates in the liver, and chronic infection often leads to cirrhosis, steatosis, and hepatocellular carcinoma. There is no vaccine to protect against HCV infection. Major improvement has been recently achieved regarding treatment of HCV infection however there is already evidence for emergence of resistance due to the high genetic variability of the HCV RNA genome. Thus it should be important, to design therapies which avoid genotypic resistance by targeting cellular proteins. With this view, inhibitors of cyclophilin have demonstrated their efficacy and are presently being evaluated in clinical trials (Rice CM., 2011). Overall, understanding the mechanisms that allow proper assembly and intracellular trafficking of HCV proteins may have a profound impact on the treatment efficacy. HCV genomic RNA is translated into a large polyprotein by the host translation machinery and processed by viral and cellular proteins to produce the viral structural proteins : the nucleocapsid (Core) and the envelope proteins E1 and E2, the p7, and the non-structural proteins (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A and NS5B) which can assemble into new virions that bud into the endoplasmic reticulum lumen and leave the host cell through its secretory pathway (Moradpour et al., 2007; Tellinghuisen and Rice, 2002; Bartenschlager et al, 2011). An important hallmark of chronic HCV infection is liver

## **RESULTATS ET DISCUSSIONS**

steatosis associated with the accumulation of lipid droplets (LDs) (Barba et al., 1997). LDs have long been considered as simple reservoir for lipid storage, they are now considered as dynamic organelles involved in many biological processes and several reports have highlighted their movement by attachment to microtubules (Barba et al., 1997; Boulant et al., 2008; Miyanari et al., 2007; Walther and Farese, 2012), nevertheless, the molecular details of the mechanisms driving LDs biogenesis, growth and intracellular movement remain largely unknown. The LDs accumulated in the HCV infected cells and the HCV core protein induces the redistribution of LDs, through the clustering of these organelles in the perinuclear area, providing a platform for virus assembly and in the production of infectious particles (Boulant et al., 2008; Depla et al., 2010).

In a precedent study, AMT-tag proteomics was used to determine the differential protein profile between intrahepatic cholangiocarcinoma cells and the counterpart non tumor cells. Septin 9 was identified among the proteins highly expressed only in tumor cells (Dos Santos et al., 2010). Subsequently, we performed immunohistochemical analysis on TMA (Tissue micro array) containing samples from different liver cancers to analyse septin 9 expression profile. Data revealed the highest expression of septin 9 in samples from hepatocellular carcinoma (HCC) from patients with chronic HCV infection. A representative immunohistochemical staining of septin 9 was presented in Figure S1A and data from analysis of the staining were recapitulated as histogram and presented on Figure S1A.

Indeed, septin 9 overexpression was reported in different cancers including ovarian, head and neck , prostate and breast cancer ( Connolly et al.; 2011; Scott et al., 2005; Hall and Russell, 2004). Moreover septins are involved in neurodegeneration (Kuhlenbaumer et al., 2005), bacterial entry (Mostowy et al., 2009; Mostowy et al., 2010) and the role of septin 6 in HCV replication was also reported (Kim et al., 2007). Accordingly, we postulated that septin 9 could have a critical role in HCV pathogenesis.

Septin family comprise 13 identified members in mammals and the complexity of this gene family is increased by the existence of alternate splicing, which dramatically increases the number of potential isoforms (Estey et al, 2011; Scott et al., 2005). Septins were first characterized in *Saccharomyces cerevisiae* by mutations that affected budding morphology and cell cycle progression (Hartwell et al., 1971). They were further implicated in several cellular functions such as membrane trafficking, cell polarity and morphogenesis (Bowen JR et al., 2011; Hu et al., 2010; Spiliotis et al., 2008). The septins are GTP binding proteins that associate with cellular membranes, actin and microtubules to ensure their cellular

## **RESULTATS ET DISCUSSIONS**

function. Septins form hetero-oligomeric complexes and higher-order structures, including filaments and rings required for their membrane association and cellular function (Estey et al., 2011; Weirich et al., 2008). Recent studies have provided structural information about the different levels of septin organization; however, few is known on the factors responsible of septin assembly (Barral and Kinoshita, 2008; Kinoshita et al., 2002; Nagata et al., 2004; Sirajuddin et al., 2007; Spiliotis and Nelson, 2006; Weirich et al., 2008).

In this study we bring important fundamental insights on the regulation of septin 9 filament assembly by PIAS1 (Protein Inhibitor for Activated STAT1) in the context of HCV infection. HCV recruited both septin 9 and PIAS1 and the interplay between these two proteins is critical for HCV replication.

## **RESULTS**

### **HCV infection increases Septin 9 protein expression and assembly in filaments.**

To assess for the eventual contribution of septin 9 in HCV replication, we used JFH1 (Japanese fulminate hepatitis 1) strain which produces infectious particles in culture and recapitulates all the steps of the HCV life cycle (Wakita et al., 2005). Huh7.5 cells were inoculated with JFH1 particles for 72 hr and the immunofluorescence staining of the cells was presented in Figure 1A. In control cells septin 9 presented a punctate distribution in the cytoplasm and infection with JFH1 caused increased signal and filamentous structure formation of septin 9 surrounding HCV core protein (Figure 1A, left panels). We could also observe some septin 9 in punctate signal and these punctate septin 9 were colocalized with HCV core. In these cells, core didn't form compact clusters ring structure around the nucleus and are more dispersed (Figure 1A, right panels). Thus, these data suggested a positive correlation between HCV core clustering and septin filamentous structure formation. After that the lysates from cells inoculated or not with JFH1 for 24 to 72 hr were analysed by immunoblot (Figure 1B). In non infected cells, a time dependent minor increase of septin 9 expression (two bands, 65 kDa and 75 kDa) was observed. The presence of JFH1 enhanced significantly septin 9 expression until 72h of inoculation and this was correlated with an increase of HCV core protein level used as infection control and the data from three different experiments were presented in the graph aside (Figure 1B).

## **RESULTATS ET DISCUSSIONS**

Septin 9 comports transcript variants, which dramatically increases the number of potential isoforms. Specific expression of these transcripts occurs in a wide variety of cancers (Connely et al., 2011b, Kalikin, 2000). Transfection of specific GFP-SEPT9 isoforms in MCF7 cells indicates that these isoforms exhibit differential localization and biological properties (Connelly et al., 2011a). So we analyzed the five characterized variants of septin 9 by QRT-PCR in HCV infection condition. The mRNA of the variant 1 was the most abundant in JFH1 infected cells however the level was not significantly different from the one in non infected cells. By opposite the variant 3 mRNA was quite undetectable (Figure 1C), Suggesting that HCV induced up regulation of septin 9 was not regulated at mRNA level. These data allowed us to conclude that HCV induced an increase of Septin 9 protein expression that was not regulated at mRNA level and its assembly in filaments.

### **PIAS1 increases and colocalizes with core in the cytoplasm of HCV infected cells.**

Septins are first and prominent SUMO (small ubiquitin-related modifier) ligase substrates in yeast (Johnson and Blobel, 1999) and the SUMO modification of septins is regulated by Siz1 (SUMO E3 ligase) enzyme in yeast. In mammals, the PIAS (Protein Inhibitor for Activated STAT1) family of proteins, first identified as negative regulators of STAT signaling, were found to be E3 SUMO ligases (Liu et al., 1998; Sharrocks, 2006) homologous to the yeast Siz proteins. Thus, according to the discrepancies observed between septin 9, protein, and mRNA levels, we evoked the possibility of a stabilisation of septin 9 protein by PIAS dependant sumoylation.

First we analyzed the expression pattern of PIAS1, the first described member of PIAS family on an adjacent section of the TMA previously used to analyse septin 9 (Figure S1A). Interestingly PIAS1 weakly detected in non tumor samples whereas a high signal of PIAS1 was detected in the perinuclear region in the hepatocarcinoma samples of patient infected with HCV (Figure S1B). Next, we examined PIAS1 expression in JFH1 infected cells (Figure 2). Immunoblot analysis indicated a dose response increase of PIAS1 expression according to JFH1 concentration which was visualized by core expression (Figure 2A). We also quantitated PIAS1 mRNA level by QRT-PCR. As observed for septin 9 variants, the increase of PIAS1 transcript was not significant (Figure 2B). Furthermore, Huh7 cells infected with JFH1 were analyzed by confocal microscopy. PIAS1 was found mainly as speckles in the nuclei of non infected cells and the signal increased dramatically

## **RESULTATS ET DISCUSSIONS**

in infected cells. However, a cytoplasmic staining of PIAS1 was observed that colocalized with strong clusters of core, suggesting that HCV induced an increase and a cytoplasmic localization of PIAS1 (Figure 2C).

### **Septin 9 and PIAS1 regulate HCV core expression and the virus replication.**

Studies described above revealed that both septin 9 and PIAS1 are recruited in the perinuclear area and regulated by HCV. Then we assessed for the requirement of these two proteins for HCV cellular expression and replication. For this purpose, Huh7.5 cells were treated with septin 9 siRNA, then infected with JFH1 and analyzed by immunoblot. A reduction of septin 9 signal was observed and this was associated with a decrease of core protein expression (Figure 3A, right part). Next the cells treated by septin 9 siRNA and infected with JFH1 were analyzed by confocal microscopy. The clusters of core disappeared and the signal was found dispersed throughout the cell indicating that septin 9 expression is important for HCV core accumulation as clusters (Figure 3A). Similarly, treatment of cells with PIAS1 siRNA reduced core cellular expression as presented on immunoblot and immunofluorescence data (Figure 3B). After that we sought for the effects of depletion of PIAS1 and septin 9 for HCV cellular replication using specific siRNA. The efficiency of siRNA of both septin 9 and PIAS1 was evaluated by QRT-PCR in Figure 3D and 3E, respectively and confirmed by immunoblot (Figure 3A and 3B). In such experimental conditions, the intracellular level of HCV genomic RNA was quantified by QRT-PCR and an important diminution was observed after depletion of septin 9 (Figure 3C). This decrease in HCV genomic RNA level was much important using PIAS1 siRNA (Figure 3C), indicating the critical role of both septin 9 and PIAS1 for HCV cellular replication.

### **Depletion of septin 9 and PIAS1 affects LDs cellular level and distribution.**

Attachment of HCV core to lipid droplets (LDs) is crucial for HCV particles assembly and release of infectious particles (Miyazawa Y, 2007). Thus, to underline the importance of septin 9 in HCV life cycle, we analyze the behaviour of LDs in septin 9 siRNA treated cells and infected with JFH1 particles. As presented in Figure 4A, LDs were dispersed in the cytoplasm in control cells whereas in JFH1 infected cells, there is an increase and redistribution of LDs as clusters that colocalized with core protein around the nucleus (Figure 4B). Depletion of septin 9 (Figure 4C) strongly reduced LDs accumulation and the cluster formation. Here again data obtained after treatment of cells with PIAS1 siRNA (Figure 4D) were similar to the results observed with septin 9 siRNA. The data

## **RESULTATS ET DISCUSSIONS**

obtained from confocal pictures were analyzed using Image J software and were presented as graph below each panel with a cartoon representing the three zones analyzed starting from the nucleus (Z1, Z2, Z3) and their LDs content. The LDs signal was mainly present around the nucleus (Z2) and the intensity strongly increased with JFH1 infection. However treatment of cells with septin 9 siRNA as well as PIAS1 siRNA before infection with JFH1 led to a decrease of the intensity and a shift of the LD signal from the centre to the cell periphery. About 15 cells were analyzed from two independent experiments and the data were presented as histogram in Figure 4E. These different results indicated a role of septin 9 and PIAS1 in HCV induced perinuclear accumulation of lipid droplets.

### **HCV infection induces stabilization of microtubules that depends of septin 9 and PIAS1.**

The dynamic microtubule network is critical for HCV infection indeed microtubules are required for virus entry into cells and particles assembly. Core directly bound to tubulin and enhanced microtubule polymerization (Roohvand et al., 2009). Moreover LDs redistribution induced by core protein is dependent of microtubules and dynein (Boulant et al., 2008). Septins guide microtubule growth, regulate their acetylation and act as scaffold to recruit others proteins to microtubules, thus septins are considered as important regulators of microtubules dependent processes (Spiliotis and Nelson, 2006, Bowen et al., 2011). Taking into account these different reports we postulated that septin 9 could be recruited by HCV for microtubule stabilization required for LD distribution and its proper replication. To test this hypothesis, non infected and JFH1 infected cells were analyzed by immunofluorescence for core and  $\alpha$ tubulin staining. Microtubules are short and formed a compact structure in non infected cells (Figure 5A, left panels), while in JFH1 infected cells, core formed important clusters around the nucleus and microtubules were organized in long filaments crossing the cell through the periphery (Figure 5A, right panels). The microtubules stabilization induced by HCV was better illustrated in the presentation of different confocal sections (Figure S2). Interestingly septin 9 formed filamentous structures that colocalised with microtubule filaments network (Figure 5B). The filaments were severely destroyed by depletion of septin 9 using specific siRNA (Figure 5C), and revealed a significant role of septin 9 in the organization of microtubules upon HCV infection. A completed Z series was presented in Figure S3. Strikingly treatment of HCV infected cells with siRNA of PIAS1 abolished the microtubule filaments and surprisingly it also suppressed septin 9 filaments. In return septin 9 signal became vesicular and mainly



## **RESULTATS ET DISCUSSIONS**

present in the perinuclear region, suggesting the critical role of PIAS1 in septin 9 filamentous structure formation (Figure 5D, S4). The effects of siRNA for septin 9 and PIAS1 on septin 9 mRNA level were represented on Figure 5E.

### **PIAS1 interacts with septin 9 and controls its filamentous structure formation and its induced LDs accumulation and microtubule organization.**

To confirm the data obtained with endogenous septin 9 using the JFH1 model system, and to further investigate the relation between septin 9, PIAS1 and HCV, we used Huh7 cells that stably expressed HCV genomic replicon (Huh7R) (Lohmann et al., 1999) to perform further mechanistic studies. Eventhough Huh7R system doesn't allow all the steps of HCV life cycle, it permitted efficient expression of all viral proteins for prolonged cultivation periods and remain a convenient and valuable tool for molecular studies. Depletion of septin 9 using siRNA reduced the expression of HCV Core and envelope (E2) proteins (Figure S5A and B). Confocal analysis confirmed the reduction of core expression as well as LDs signal (Figure S5C). These data were very similar to those obtained using JFH1 system (Figure 3) and confirmed the role of septin 9 on HCV cellular expression and LDs accumulation.

Next, Huh7R cells were transfected with the cDNA of septin 9 variant 1 (septin 9\_V1), the highest expressed in JFH1 infected cells (Figure 1C). Expression of septin 9\_V1 was visualized on immunoblot by the presence of a major band at 75kDa and a faint one at 68kDa. As expected, expression of septin 9\_V1 was associated with an increased of HCV core and envelope protein E2 expressions (Figure S5D,E). In the cells overexpressing septin 9\_V1, we assessed for a probable interaction between septin 9 and PIAS1 by performing immunoprecipitation using septin\_V1 tag antibody (anti V5). Interestingly PIAS1 was revealed in the immunoprecipitated, indicating a cellular interaction between these two proteins (Figure S6A). For further investigations, Huh7R cells were treated with PIAS1 siRNA for 24 h and then transfected with septin 9\_V1 cDNA. As shown in Figure S6B, knockdown of PIAS1 resulted in a marked inhibition of the 75 kDa band of Septin 9\_V1. To evaluate the functional consequence of these immunoblot data, cells were stained for tubulin and septin 9\_V1 and analyzed by confocal microscopy (Figure 6A). Septin 9\_V1 formed filamentous structures that partly colocalized with an organized microtubule network compared to cells transfected with empty vector . Next the transfected cells were treated with nocodazole that depolymerized microtubule. This treatment disrupted the curved filaments of septin 9\_V1, whereas septin 9\_V1 formed

## **RESULTATS ET DISCUSSIONS**

impressive stress fibers structure (Figure 6A). The effect of nocodazole on septin 9 filament was previously reported (Surka et al. 2002). Conversely, treatment of cells with taxol that blocked microtubules filaments, induced the formation of stronger septin 9\_V1 filaments (Figure S7), indicating that somehow septin\_V1 assembly in filament is dependent of microtubule network. Strikingly, when these Huh7 cells overexpressing septin 9\_V1 were treated with PIAS1 siRNA no septin filaments were formed (Figure 6A), a vesicular septin 9 was present around the nucleus as observed with endogenous septin 9 (Figure 5D). This dramatic effect of PIAS1 inhibition on septin filament structure was better illustrated in the presentation of the different confocal sections in Figure S6C.

Additionally, the effect of PIAS1 depletion was assessed on the LDs content of septin 9\_V1 transfected Huh7R cells. Compared to cells transfected with empty vector, septin\_V1 cells displayed a higher content of LDs that formed a well organized clusters surrounding septin 9\_V1 filaments. Treatment of cells with PIAS1 siRNA as described in Figure 6A promoted an important decrease and dispersion of LDs and also prevented the formation of septin 9 filaments (Figure 6B). Here again these data are very similar to those observed with endogenous septin 9 in JFH1 infected cells (Figure 5D) and reinforced the role of PIAS1 as a regulator of septin filaments organization as well as its involvement in LDs accumulation and distribution.

### **SUMO1 is required for septin 9 expression, LDs accumulation and HCV replication.**

According to the important regulatory function of PIAS1 on septin 9 and our hypothesis of septin 9 sumoylation by PIAS1, we sought for an association of septin 9 with SUMO1 by performing immunoprecipitation. This was achieved using Huh7R cells transfected with septin 9\_V1 cDNA. Interestingly SUMO1 was detected at 75kDa in septin 9\_V1 immunoprecipitate (Figure 7A). We then analyzed the effect of depletion of SUMO1 on septin 9 and lipid droplet formation as reported above with siRNA of PIAS1 (Figure 6B). SUMO1 siRNA caused a dramatic inhibition of septin 9 expression and none of the two bands was visible on immunoblot (Figure 7B). These data were confirmed by confocal microscopy analysis (Figure 7C). Here again septin 9\_V1 which was also labeled on the nuclei as rarely observed in our experiments, induced accumulation of lipid droplet around the nucleus and treatment with SUMO1 siRNA decrease and dispersed LDs while septin 9\_V1 signal is quite undetectable. Together these data strongly suggested the importance of SUMO1 in septin 9 expression.

## **RESULTATS ET DISCUSSIONS**

Thus we decided to analyse the eventual effect of SUMO1 in HCV replication using the infectious JFH1 model system. Treatment of cells with siRNA of SUMO1 reduced core expression as presented on immunoblot Figure 7D and immunofluorescence data Figure 7E. Finally according to all these data, we analyzed the effects of SUMO1 down regulation on HCV cellular replication by quantitative RT-PCR. An important decrease of HCV genomic RNA was observed in cells treated with SUMO1 before JFH1 infection compared to control cells (Figure 7F) indicating that SUMO1 is also required for HCV replication.

### **DISCUSSION**

This study demonstrated a critical role of Septin 9 in HCV replication. We showed that HCV recruited and promoted septin 9 assemblies in high order filaments through PIAS1 and SUMO1 modification for its cellular replication. This work brought significant insights on the host cellular machineries exploited by HCV for its replication and it also provides new fundamental data on the structural and functional features of septin 9.

Different studies have suggested that cellular LDs play a crucial role in the HCV life cycle. Interactions between HCV proteins, especially the core protein and LDs are required for the morphogenesis and production of infectious HCV (Boulant et al., 2008; Depla et al., 2010). Our study revealed that septin 9 modulated the redistribution of LDs and their association with HCV core and thus contributed to establish lipid environment required for virus production. This is reminiscent to the binding capacity of septins to phosphoinositides, a component present in the surface of the LDs (Bartz et al., 2007). Indeed septins specifically bind phosphoinositides (PtdIns) and this interaction is an important regulator for their higher-order assemblies and cellular functions, although the physiopathological relevance was dimly investigated (Bertin, A., et al, 2010; Tanaka-Takiguchi et al, 2009; Zang et al., 1999).

The redistribution of LDs towards the nuclear periphery in cells expressing core is dependent of microtubule and moreover disruption of microtubules reduced virus particle release (Boulant et al., 2008; Miyanari et al., 2007). Importantly, our results showed that HCV increased microtubule polymerization that was found colocalised with septin 9. Depletion of septin 9 in these cells altered microtubules network organization, suggesting that septin 9 participates in the HCV induced microtubules polymerization. Thus engagement of septin 9 with cellular transport systems is important for HCV life cycle and

## **RESULTATS ET DISCUSSIONS**

extended the cellular function of septin 9 to infection. In this context the role of septin 6 in HCV replication was previously reported. These data indicated that septin 6 interacted directly with an RNA binding protein and acted as a scaffold protein to facilitate the positioning of HCV replication complex. Nevertheless the structural features and the association of septin 6 with cytoskeleton were not investigated (Kim et al., 2007). Nevertheless different reports emphasized the participation of septin in bacteria invasion into the host cell and on bacterial actin dependent motility (Mostowy et al. 2009; 2010). Thus septins appeared as crucial component of the cytoskeleton exploited by several pathogens to invade and develop in host cell as recently reviewed (Mostowy and Cossart, 2012).

Another important finding is the identification of PIAS1 as a regulator of septin 9 assembly in filament. Eventhough much is known about septin filament organization, the factor that regulates the assembly and disassembly are largely unknown. Previous data from the literature have demonstrated that yeast septins interact with SUMO and sumoylation may be important for assembly of septin filaments (Johnson and Blobel, 1999). By contrast very few is know about mammalian septin sumoylation (Takahashi et al., 2008, Zhu et al., 2010). Here we provided interesting data on the possible sumoylation of septin 9 by PIAS1 which needs to be further elucidated. Both PIAS1 and SUMO1 were found in Septin 9\_V1 immunoprecipitate. Knockdown of PIAS1 regulates septin 9 expression pattern (Figures 5 and 6), disrupted its filamentous structure and septin 9 became vesicular. However inhibition of SUMO1 by siRNA abolished expression of septin 9 and impaired the structural studies. SUMO1 has a large number of targets including transcription factors and cytoplasmic proteins that might explain the drastic effect of its knock down on septin 9 expression compared to PIAS1. Further studies will be required to precise the SUMO modification of septin 9 in mammalian cells.

Yeast septins are modified in the cytoplasmic compartment by the E3 ligase Siz1 (the homolog of mammalian PIAS1) (Johnson and Gupta, 2001). Some studies showed that Siz1 is mainly intranuclear, but during mitosis a fraction of Siz1 colocalized with septins in the cytoplasm at the mother cell side of the bud neck (Johnson, 2004). Similarly, in this report, PIAS1 was found mainly intranuclear in non infected cells, however after JFH1 infection an increased fraction of PIAS1 was found in the cytoplasm and colocalized with HCV core. This change in PIAS1 and its relocalization might be a determining step in septin SUMOylation dependent processes like HCV replication. Thus, we suggested that PIAS1 interacts with and mediates septin 9 SUMO1 modification, a process necessary for

## **RESULTATS ET DISCUSSIONS**

septin 9 assembly in filament, its stabilization and recruitment at the perinuclear region in HCV replication site. More experiments will be settled to identify the factors involved in PIAS1 cytoplasmic localization and the connection with septin 9 sumoylation.

Additionally this study brought new perception of septin 9 function regarding both microtubule and lipid structure organization. This later point is a timely finding since there is an emerging literature on the crucial role of lipid droplets in the replication of different pathogens (Herker and Ott, 2012) and to some extent there is a growing literature on phosphoinositides function in HCV replication (Reiss et al., 2011). The surface of LDs contains phospholipids that included phosphoinositides. Thus one explanation for the implication of septin 9 in LDs redistribution could be connected to the known interaction between phosphoinositides and septins that could initiate septins complexes filaments formation (Estey et al., 2011). We proposed that HCV infection conducts to assembly of septin 9 in filaments through PIAS1. This may provide scaffolds to organize the microtubules network and LDs redistribution required for HCV assembly and replication.

To conclude, this study illuminates a new function of septin 9 in HCV life cycle through its association with lipids and microtubules. These events might depend on septin 9 SUMO1 modification by PIAS1 and highlight an important function for PIAS1, beyond its action in pathogenesis mediated by inhibition of STAT1 transcriptional activity (Shuai and Liu, 2005). These findings also provide a step forwards in understanding the relationship between HCV and its host and open new therapeutic directions.

### **Acknowledgements**

A.A. was supported by a fellowship of RII Pasteur, University of Paris XI and CHB association. CG was supported by a grant from ANRS. This work was supported by a grant from Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC/SUBV/CKLQ6) to AGD. We thank T. Wakita (National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan) for providing the pJFH1 plasmid, C. Rice (Rockefeller University, New York, NY) for the Huh-7.5 cell line and H. Russell (Queen University, Belfast, UK.) for providing septin 9\_V1 construct. We also thank C. Comera (INRA, UMR1331, Toulouse) for advices on lipid staining and for providing the LD450 Dye and all the members of the INSERM U785 for helpful discussions. We thank A. Jalil and E. Perret from the imagery services at IGR (Villejuif) and Institut Pasteur (Paris).

## **RESULTATS ET DISCUSSIONS**

### **Competing financial interests**

The authors declare no competing financial interests.

### **METHODS**

**Antibodies and reagents:** anti mouse actin and  $\beta$  tubulin were from Sigma, anti rabbit  $\alpha$  tubulin, anti mouse core, anti rabbit SUMO1, PIAS1 and septin 9 were from Abcam. Anti-mouse Alexa Fluor 488 or 546 were from Invitrogen. Nuclei were stained with TO-PRO-3 Iodide or Hoechst from Invitrogen. The mouse antibody to HCV envelope protein E2 was from Dr. Jean Dubuisson (Center of infection and immunity of Lille, France). Nocodazole and taxol were from Sigma.

**Cell culture:** Huh7.5 or Huh7 containing HCV genomic replicon (Huh5R) cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM; Invitrogen) containing 4.5 g/l glucose supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 1% nonessential amino acids (Invitrogen) and 1% penicillin/streptomycin (Invitrogen).

**Plasmids, siRNAs and cell transfection:** cDNA of septin 9 variant 1 transcript within pcDNA3.1/V5-His-TOPO vector (cDNA septin V\_1) was from Dr Russell (CCRCB, Queens University Belfast). siRNA from septin 9 is a Stealth RNAi™ siRNA (set of 3 oligonucleotides) from Invitrogen. siRNA for PIAS1 (sc-36219) and SUMO1 (sc-29498) were from Santa Cruz and control siRNA from Genecust. cDNA or siRNA transfections were performed using FuGene 6 transfection reagent (Roche Diagnostics) and RNAimax (Invitrogen) respectively following the manufacturer's protocol.

### **Immunoblot and immunoprecipitation**

Cells were collected on ice, washed and lysed in the following buffer: 20mM Tris, HCl, 100mM NaCl, 1% Triton X100 and 10mM EDTA at PH 7.4 containing protease and phosphatase inhibitor cocktail (Roche diagnostics). The proteins were separated on SDS-PAGE, blotted onto a PVDF membrane and visualized with chemiluminescence reagent (Amersham).

For immunoprecipitation, cell lysates were in the buffer described above, cleared by centrifugation, and the supernatant was added to protein G-Sepharose beads, pre-complexed for 1h at 4°C to antibody and agitated for 2h at 4°C. The beads were washed using lysis buffer containing 0.1% Triton X-100, then resuspended in Laemmli buffer and analysed by immunoblot. For control, antibody was not added to the lysate.

## **RESULTATS ET DISCUSSIONS**

**Immunofluorescence staining:** Huh7.5 cells were grown on glass coverslips in 12-well plates, treated according to the experiments, fixed with a 3.7% paraformaldehyde, permeabilized and saturated with PBS supplemented with 0.7% fish gelatin and 0.025% saponin. Primary antibodies were diluted with permeabilization solution and incubated with cells. After washes, staining was performed with fluorescent secondary antibodies, phalloidin and TO-PRO 3 or Hoechst. Samples were observed with a Zeiss 510 LSM confocal microscope or Leica TCS SP5 (Leica Microsystems). The lipophilic fluorescence dye LD 540 is used to stain lipid droplets.

**JFH1/HCVcc production and inoculation:** high-titer stock of JFH1/HCVcc (JFH1) was prepared as described (Kato et al., 2006) with varying concentrations (from 0.2 to 0.5 Geq/cell), depending on the experiment. After 16h incubation at 37°C, the inoculum was removed and cells were washed three times with DMEM. Cells were further maintained in culture for required time.

**RNA extraction and RT-QPCR analysis:** Total RNA was isolated using RNAlater, solution (Eurobio) and intracellular levels of positive strand HCV RNA were quantified by a strand-specific RT-qPCR technique described previously (Molina et al., 2007) using a Light Cycler Fast Start DNA MasterPlus SYBR Green I mix (Roche) on a *Light Cycler*® 480 Real-Time PCR System (Roche). The triplicate mean values were calculated according to the Ct quantification method (Pfaffl 2001) using the GAPDH gene transcription as reference for normalization. Relative mRNA levels in control cells were equaled to 1 and the other values were expressed relative to this.

The same protocol was used for septin 9 variants analysis and the primers used are presented in table 1

### **Statistical analyses.**

Comparison of mean values was conducted with unpaired Student's t tests. Statistical significance was determined at \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*  $P < 0.0001$ .

## **RESULTATS ET DISCUSSIONS**

### **REFERENCES**

- Barba, G., Harper, F., Harada, T., Kohara, M., Goulinet, S., Matsuura, Y., Eder, G., Schaff, Z., Chapman, M. J., Miyamura, T., and Brechot, C.** (1997). Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 1200-1205.
- Barral Y, Kinoshita M** (2008) Structural insights shed light onto septin assemblies and function. *Current Opinion in Cell Biology* 20: 12–18.
- Bartenschlager R, Penin F, Lohmann V, André P.** (2011) Assembly of infectious hepatitis C virus particles. *Trends in Microbiology* , 19, 23-
- Bartz R, Li WH, Venables B, Zehmer JK, Roth MR, Welti R, Anderson RG, Liu P, Chapman KD.** (2007). Lipidomics reveals that adiposomes store ether lipids and mediate phospholipid traffic. *J. Lipid Res.* 48:837–4720.
- Bertin A, McMurray MA, Thai L, Garcia G 3rd, Votin V, Grob P, Allyn T, Thorner J, Nogales E.** (2010). Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate promotes budding yeast septin filament assembly and organization. *J Mol Biol* 404, 711-731.
- Boulant, S., Douglas, M. W., Moody, L., Budkowska, A., Targett-Adams, P., and McLauchlan, J.** (2008). Hepatitis C virus core protein induces lipid droplet redistribution in a microtubule- and dynein-dependent manner. *Traffic* 9, 1268-1282.
- Bowen JR, Hwang D, Bai X, Roy D, Spiliotis ET.** (2011). Septin GTPases spatially guide microtubule organization and plus end dynamics in polarizing epithelia. *J Cell Biol.*, 194, 187-97
- Depla, M., Uzbekov, R., Hourieux, C., Blanchard, E., Le Gouge, A., Gillet, L. and Roingeard, P.** (2010) Ultrastructural and quantitative analysis of the lipid droplet clustering induced by hepatitis C virus core protein. *Cell. Mol. Life Sci.* 67, 3151–3161.
- Dos Santos, A., Court, M., Thiers, V., Sar, S., Guettier, C., Samuel, D., Brechot, C., Garin, J., Demaugre, F., and Masselon, C.D.** (2010). Identification of cellular targets in human intrahepatic cholangiocarcinoma using laser microdissection and accurate mass and time tag proteomics. *Mol Cell Proteomics* 9, 1991-2004.
- Estey, M. P., Kim, M. S., and Trimble, W. S.** Septins. *Curr Biol* 21, R384-387.
- Hall, P. A., and Russell, S. E.** (2004). The pathobiology of the septin gene family. *J Pathol* 204, 489-505.
- Hartwell, L.H.** (1971). Genetic control of the cell division cycle in yeast. IV. Genes controlling bud emergence and cytokinesis. *Exp Cell Res* 69, 265-276.



## **RESULTATS ET DISCUSSIONS**

- Herker, E. and Ott, M.** (2012) *Emerging Role of Lipid Droplets in Host/Pathogen Interactions*. *J. Biol. Chem.*, 287, 2280-2287.
- Hu Q, Milenkovic L, Jin H, Scott MP, Nachury MV, Spiliotis ET, Nelson WJ.** (2010). *A septin diffusion barrier at the base of the primary cilium maintains ciliary membrane protein distribution*. *Science*. 329, 436-9.
- Johnson, ES.** (2004), *Protein modification by SUMO*. *Annu. Rev. Biochem.* 73, 355-382.
- Johnson, E. S., and Blobel, G.** (1999). *Cell cycle-regulated attachment of the ubiquitin-related protein SUMO to the yeast septins*. *J Cell Biol* 147, 981-994.
- Johnson, E.S., Gupta AA.** (2001). *an E3-like factor that promotes SUMO conjugation to the yeast septins*. *Cell*. 2001 Sep 21;106(6):735-44.
- Kalikin, L.M., Sims, H.L. and Petty, E.M.** (2000) *Genomic and expression analyses of alternatively spliced transcripts of the MLL septin-like fusion gene (MSF) that map to a 17q25 region of loss in breast and ovarian tumors*. *Genomics*. 63, 165-172.
- Kato, T., Date, T., Murayama, A., Morikawa, K., Akazawa, D., and Wakita, T.** (2006). *Cell culture and infection system for hepatitis C virus*. *Nat Protoc* 1, 2334-2339.
- Kim, C. S., Seol, S. K., Song, O. K., Park, J. H., and Jang, S. K.** (2007). *An RNA-binding protein, hnRNP A1, and a scaffold protein, septin 6, facilitate hepatitis C virus replication*. *J Virol* 81, 3852-3865.
- Kinoshita M, Field CM, Coughlin ML, Straight AF, Mitchison TJ** (2002) *Self and Actin Templated Assembly of Mammalian Septins*. *Developmental Cell* 3: 791–802.
- Kuhlenbaumer, G., Hannibal, M. C., Nelis, E., Schirmacher, A., Verpoorten, N., Meuleman, J., Watts, G. D., De Vriendt, E., Young, P., Stogbauer, F., et al.** (2005). *Mutations in SEPT9 cause hereditary neuralgic amyotrophy*. *Nat Genet* 37, 1044-1046.
- Liu, B., Liao, J., Rao, X., Kushner, S. A., Chung, C. D., Chang, D. D., and Shuai, K.** (1998). *Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 10626-10631.
- Lohmann, V., Korner, F., Koch, J., Herian, U., Theilmann, L., and Bartenschlager, R.** (1999). *Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line*. *Science* 285, 110-113.
- Miyinari, Y., Atsuzawa, K., Usuda, N., Watashi, K., Hishiki, T., Zayas, M., Bartenschlager, R., Wakita, T., Hijikata, M., and Shimotohno, K.** (2007). *The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production*. *Nat Cell Biol.*, 9, 1089-1097.

## **RESULTATS ET DISCUSSIONS**

- Molina, S., Castet, V., Fournier-Wirth, C., Pichard-Garcia, L., Avner, R., Harats, D.** (2007) *The low-density lipoprotein receptor plays a role in the infection of primary human hepatocytes by hepatitis C virus. J Hepatol.* **46**, 411-9.
- Moradpour, D., Penin, F., and Rice, C. M.** (2007). *Replication of hepatitis C virus. Nat Rev Microbiol.* **5**, 453-463.
- Mostowy S, Nam Tham T, Danckaert A, Guadagnini S, Pizarro-Cerda J, Cossart P.** (2009) *Septins regulate bacterial entry into host cells. PLoS One* **4**, e4196.
- Mostowy, S., Bonazzi, M., Hamon, M. A., Tham, T. N., Mallet, A., Lelek, M., Gouin, E., Demangel, C., Brosch, R., Zimmer, C., et al.** (2010) *Entrapment of intracytosolic bacteria by septin cage-like structures. Cell Host Microbe* **8**, 433-444.
- Mostowy S, Cossart P.** (2012) *Septins: the fourth component of the cytoskeleton. Nat Rev Mol Cell Biol.* **13**, 183-194.
- Nagata K-i, Asano T, Nozawa Y, Inagaki M.** (2004) *Biochemical and Cell Biological Analyses of a Mammalian Septin Complex, Sept7/9b/11. J Biol Chem.* **279**: 55895–55904.
- Reiss S, Rebhan I, Backes P, Romero-Brey I, Erfle H, Matula P, Kaderali L, Poenisch M, Blankenburg H, Hiet MS, Longerich T, et al.** (2011). *Recruitment and activation of a lipid kinase by hepatitis C virus NS5A is essential for integrity of the membranous replication compartment. Cell Host Microbe*, **20**, 32-45.
- Rice CM,** (2011) *New insights into HCV replication ; potential antiviral targets, Top Antivir Med.* **19**, 117-20.
- Roohvand F, Maillard P, Lavergne JP, Boulant S, Walic M, Andréo U, Goueslain L, Helle F, Mallet A, McLauchlan J, Budkowska A.** (2009). *Initiation of hepatitis C virus infection requires the dynamic microtubule network: role of the viral nucleocapsid protein. J Biol Chem.*, **284**, 13778-91.
- Scott, M., Hyland, P. L., McGregor, G., Hillan, K. J., Russell, S. E., and Hall, P. A.** (2005). *Multimodality expression profiling shows SEPT9 to be overexpressed in a wide range of human tumours. Oncogene* **24**, 4688-4700
- Sharrocks, A. D.** (2006). *PIAS proteins and transcriptional regulation--more than just SUMO E3 ligases? Genes Dev* **20**, 754-758.
- Shuai, K., and Liu, B.** (2005). *Regulation of gene-activation pathways by PIAS proteins in the immune system. Nat Rev Immunol* **5**, 593-605.
- Spiliotis, E.T. & Nelson, W.J.** (2006). *Here come the septins: novel polymers that coordinate intracellular functions and organization. J Cell Sci.* **119**, 4-10.

## **RESULTATS ET DISCUSSIONS**

- Spiliotis, E.T., Hunt, S.J., Hu, Q., Kinoshita, M. & Nelson, W.J.** (2008). *Epithelial polarity requires septin coupling of vesicle transport to polyglutamylated microtubules.* *J Cell Biol* 180, 295-303.
- Sirajuddin, M., Farkasovsky, M., Hauer, F., Kuhlmann, D., Macara, I. G., Weyand, M., Stark, H., and Wittinghofer, A.** (2007). *Structural insight into filament formation by mammalian septins.* *Nature* 449, 311-315.
- Surka MC., Tsang CW., Trimble WS.** (2002) *The mammalian septin MSF localizes with microtubules and is required for completion of cytokinesis.* *Mol Biol Cell.* 13, 3532-45.
- Takahashi Y, Iwase M, Strunnikov AV, Kikuchi Y.** (2008) *Cytoplasmic sumoylation by PIAS-type Siz1-SUMO ligase.* *Cell Cycle.* 7, 1738-44
- Tanaka-Takiguchi, Y., Kinoshita, M. and Takiguchi, K.** (2009) *Septin-mediated uniform bracing of phospholipid membranes.* *Curr Biol* 19, 140-145 (2009).
- Tang, H., and Grise, H.** (2009). *Cellular and molecular biology of HCV infection and hepatitis.* *Clin Sci (Lond)* 117, 49-65.
- Tellinghuisen, T. L., and Rice, C. M.** (2002). *Interaction between hepatitis C virus proteins and host cell factors.* *Curr Opin Microbiol* 5, 419-427.
- Connolly D, Yang Z, Castaldi M, Simmons N, Oktay MH, Coniglio S, Fazzari MJ, Verdier-Pinard P, Montagna C.** (2011). *Septin 9 isoform expression, localization and epigenetic changes during human and mouse breast cancer progression.* *Breast Cancer Res*,13, R76.
- Connolly D, Abdesselam I, Verdier-Pinard P, Montagna C.** (2011) *Septin role in tumorigenesis.* *Biol Chem.*, 392, 725-38.
- Walther TC, Farese RV Jr** (2012). *Lipid droplets and cellular lipid metabolism.* *Annu Rev Biochem.* ;81:687-714.
- Wakita, T., Pietschmann, T., Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., Murthy, K., Habermann, A., Krausslich, H. G., Mizokami, M., et al.** (2005). *Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome.* *Nat Med* 11, 791-796.
- Weirich, C. S., Erzberger, J. P., and Barral, Y.** (2008). *The septin family of GTPases: architecture and dynamics.* *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9, 478-489.
- Zhang, J., Kong, C., Xie, H., McPherson, P.S., Grinstein, S., and Trimble, W.S.** (1999). *Phosphatidylinositol polyphosphate binding to the mammalian septin H5 is modulated by GTP.* *Curr Biol* 9, 1458-1467.

## **RESULTATS ET DISCUSSIONS**

**Zhu, J. L., Lin, S. L., Li, M., Ouyang, Y. C., Hou, Y., Schatten, H., and Sun, Q. Y. (2010).**  
*Septin2 is modified by SUMOylation and required for chromosome congression in mouse oocytes. Cell Cycle 9, 1607-1616.*

### **LEGENDS OF FIGURES**

#### **Figure 1. Analysis of septin 9 in JFH1 infected cells.**

- (A) Immunofluorescence analysis of septin 9 (green), HCV core (red) and nuclei (blue) in Huh7.5 cells non infected (NI) or infected with HCV JFH1 strain (0.4 Geq/cell) for 72h. Zoom pictures are in dot squares. Scale bars (10µm).
- (B) Immunoblot analysis of septin 9 and HCV core in lysates of Huh7.5 cells treated in Huh7.5 cells non infected (NI) or infected with HCV JFH1 strain (0.4 Geq/cell) for 24, 48 and 72 h. Actin was used as loading control.
- (C) Quantitative Real time PCR (RT-PCR) analysis of septin 9 variants (V1, V2, V3, V4, V5) in Huh7.5 cells non infected (NI) or infected with HCV JFH1 strain (0.4 Geq/cell) for 72h.

#### **Figure 2. Analysis of PIAS1 in JFH1 infected cells.**

- (A) Immunoblot analysis of PIAS1 in lysates of Huh7.5 cells infected with JFH1 at two different concentrations (0.2 and 0.5 Geq/cell named C1 and C2 respectively) for 72h. Actin was used as loading control.
- (B) Immunofluorescence analysis of PIAS1 (green), HCV core (red) and nuclei (blue) in Huh7.5 cells non infected (NI) or infected with HCV JFH1 strain (0.5 Geq/cell) for 72h. Zoom areas are in dot squares. Scale bars (10µm)
- (C) Real time RT-PCR analysis of PIAS1 in Huh7.5 cells non infected (NI) or infected with HCV JFH1 strain (0.5 Geq/cell) for 72h.

#### **Figure 3. septin 9 and PIAS1 regulate HCV core protein and genomic RNA expression.**

- (A) Immunofluorescence analysis of core (red) and nuclei (blue) in Huh7.5 cells transfected with control (siCtrl) or septin 9 siRNAs (si3, 75 pmoles/assay) for 48h and later infected with JFH1 (0.5 Geq/cell) for another 48h. Zoom areas are in dot squares. Scale bar (10µm). Immunoblot analysis of septin 9 and HCV core in Huh7.5 cells treated as

## **RESULTATS ET DISCUSSIONS**

described above for immunofluorescence using two different siRNAs (si1 and si3). Actin was used as loading control.

(B) Immunofluorescence analysis of core (red) and nuclei (blue) in Huh7.5 cells treated with control siRNA (siCtrl) or with specific si RNA of PIAS1 (100 pmoles/assay) for 48 h and later infected with JFH1 (0.5 Geq/cell) for another 48 h infected. Scale bar (10µm).

Immunoblot analysis of PIAS1 and HCV core in lysate of Huh7.5 cells treated with control siRNA (siCtrl) or with PIAS1 si RNAs (75 and 100 pmoles/assay) for 48hr and later infected with JFH1(0.5 Geq/cell) for another 48h. Actin was used as loading control.

(C) QRT-PCR analysis of HCV RNA from Huh7.5 cells infected with JFH1 and transfected as in (A) using siRNA specific of septin 9 and PIAS1.

(D) QRT-PCR analysis of septin 9 from Huh7.5 cells infected with JFH1 and transfected as in (A) using siRNA specific of septin 9 (si1, si3).

(E) QRT-PCR analysis of PIAS1 from Huh7.5 cells infected with JFH1 and treated as in (A) using siRNA specific of PIAS1.

### **Figure 4. Septin 9 and PIAS1 regulate Lipid droplets (LDs) formation and their association with the HCV core protein.**

(A,B) Immunofluorescence labeling of lipid droplets (red), core (green) and nuclei (blue) in non infected (NI) Huh7.5 cells, treated with control siRNA (A) or in cells infected with JFH1 (B). Scale bar are 10µm.

(C) Immunofluorescence labeling of lipid droplets (red), core (green) and nuclei (blue) in Huh7.5 cells were treated with septin 9 siRNA for 48h and then infected with HCV JFH1 strain (0.4 Geq/cell) for 48hr. Scale bar (10µm).

(D) Same experiment than in (C) using PIAS1 siRNA. Scale bar (10µm).

(E) LDs abundance in experiments described in panels A, B, C and D.

### **Figure 5. PIAS1 regulates both septin 9 and microtubule filaments assembly in JFH1 infected cells.**

(A) Immunofluorescence analysis of alpha tubulin (red), core (green) and nuclei (blue) in Huh7.5 cells infected or not (NI) with JFH1. Scale bar (10µm).

(B, C, D) Immunofluorescence analysis of Septin 9 (green),  $\beta$ tubulin (red) and nuclei (blue) in Huh7.5 cells treated with siRNA control (B), and specific siRNA of septin 9 (C) or PIAS1 (D) respectively for 48H before infection with JFH1 for another 48hr. Scale bar (10µm).

## **RESULTATS ET DISCUSSIONS**

(E) QRT-PCR analysis of septin 9 in experiments described in B, C and D.

### **Figure 6. PIAS1 regulates microtubule stabilization and both septin 9 filaments assembly and LDs formation in Huh7R cells.**

(A) Huh7R cells were transfected either with empty vector or with cDNA of septin 9\_V1. The later were also treated with 33µM nocodazole for 3h or with siRNA of PIAS1 (siPIAS1) for 24h as indicated on the pictures and analyzed by confocal microscopy for septin 9\_V1 (green),  $\beta$ tubulin (red) and nuclei (blue). Scale bar (10µm).

(B) Huh7R cells treated as in (A) with siRNA of control (siCtrl) and siRNA of PIAS1 (siPIAS1) were analysis for Septin 9\_V1 (green), LDs (red). Scale bar (10µm).

### **Figure 7. SUMO1 co-immunoprecipitated with Septin 9, regulates its expression, LDs formation and HCV replication.**

(A) Huh7 cells containing the HCV genomic replicon (Huh7R) were transfected with the cDNA of the variant 1 of septin 9 containing a V5 tag (septin 9\_V1). Immunoprecipitation was performed with the v5 tag antibody (anti V5) or with only beads and septin 9\_V1 and SUMO1 were revealed using antiV5 or anti SUMO1 antibodies respectively.

(B) Immunoblot analysis of SUMO1, septin 9\_V1 in Huh7R cells transfected with cDNA of septin9\_V1 for 24 h and then for another 24 h with specific siRNA of SUMO1 (siSUMO1).

(C) Immunofluorescence analysis of Septin 9\_V1 (green), LDs (red) and nuclei (blue) in Huh7R cells treated as in (B) with siSUMO1. Scale bar (10µm).

(D) Immunoblot analysis of HCV core and SUMO1 in Huh7.5 cells infected with HCV JFH1 strain (0.4 Geq/cell) for 48h treated for 48h with siRNA specific of SUMO1 before the infection. Actin was used as loading control.

(E) Immunofluorescence labeling of lipid droplets (red), core (green) and nuclei (blue) in Huh7.5 cells treated as in (D). Scale bar (10µm).

(F) Q RT-PCR analysis of HCV RNA isolated from Huh7.5 cell infected with JFH1 and transfected as in (D) using SUMO1 siRNA.

## **RESULTATS ET DISCUSSIONS**

### **Supplementary figure 1. Highest expressions of septin 9 and PIAS1 in samples from hepatocellular carcinoma (HCC) from patients with chronic HCV infection**

(A) Immunohistochemical analysis of septin 9 expression profile on TMA (Tissue micro array) containing samples from hepatocellular carcinoma (HCC) from patients with chronic HCV infection and data analysis of the staining recapitulated as histogram (right panel).

(B) Immunohistochemical staining of PIAS1 expression profile (left panel) and data analysis of the staining recapitulated as histogram (right panel) from hepatocellular carcinoma (HCC) from patients with chronic HCV infection.

### **Supplementary figure 2. HCV infection induces stabilization of microtubules**

Immunofluorescence analysis (different confocal sections) of alpha tubulin (red), core (green) and nuclei (blue) in Huh7.5 cells infected or not (NI) with JFH1. Scale bar (10µm).

### **Supplementary Figure 3. Septin 9 regulates microtubule filaments assembly in JFH1 infected cells.**

Immunofluorescence analysis (different confocal sections) of Septin 9 (green),  $\beta$ tubulin (red) and nuclei (blue) in Huh7.5 cells treated with siRNA control, and specific siRNA of septin 9 for 48H before infection with JFH1 for another 48hr. Scale bar (10µm).

### **Supplementary Figure 4. PIAS1 regulates both septin 9 and microtubule filaments assembly in JFH1 infected cells.**

Immunofluorescence analysis (different confocal sections) of Septin 9 (green),  $\beta$ tubulin (red) and nuclei (blue) in Huh7.5 cells treated with siRNA of PIAS1 for 48H before infection with JFH1 for another 48hr. Scale bar (10µm).

### **Supplementary Figure 5. Septin 9 regulates HCV core and E2 proteins expression, Lipid droplets (LDs) formation and their association with the HCV core protein.**

(A) Immunoblot analysis of septin 9 and HCV core and E2 proteins in Huh7 cells expressed HCV genomic replicon (Huh7R) transfected with control (siCtrl) or septin 9 siRNAs (si3, 75 and 100 pmoles/assay) for 48h. Actin was used as loading control.

(B) Statistical analysis recapitulated as histogram of septin 9 and HCV core and E2 in Huh7R treated as described above for immunoblot analysis.

## **RESULTATS ET DISCUSSIONS**

(C) Immunofluorescence analysis of core (green), LDs (red) and nuclei (blue) treated as described above for Immunoblot analysis using control siRNA (siCtrl) and septin 9 siRNA (si3). Scale bar (10µm).

(D) Immunoblot analysis of septin 9\_V1 and HCV core and E2 in Huh7R cells transfected with empty vector or cDNA of septin 9\_V1 (1µg/assay) for 48h. Actin was used as loading control.

(E) Statistical analysis recapitulated as histogram of septin 9\_V1 and HCV core and E2 in Huh7R treated as described above for immunoblot analysis in (D).

### **Supplementary Figure 6. PIAS1 is co-immunoprecipitated with Septin 9, regulates its expression and microtubule stabilization.**

(A) Huh7 cells containing the HCV genomic replicon (Huh7R) were transfected with the cDNA of the variant 1 of septin 9 containing a V5 tag (septin 9\_V1). Immunoprecipitation was performed with the v5 tag antibody (anti V5) or with only beads and septin 9\_V1 and PIAS1 were revealed using antiV5 or anti PIAS1 antibodies respectively.

(B) Immunoblot analysis of PIAS1, septin 9\_V1 in Huh7R cells transfected with cDNA of septin9\_V1 for 24 h and then for another 24 h with specific siRNA of PIAS1 (siPIAS1).

(C) Immunofluorescence analysis (different confocal sections) of Huh7R cells treated as in (B) of Septin 9\_V1 (green),  $\alpha$  Tubulin (red) and nuclei (blue). Scale bar (10µm).

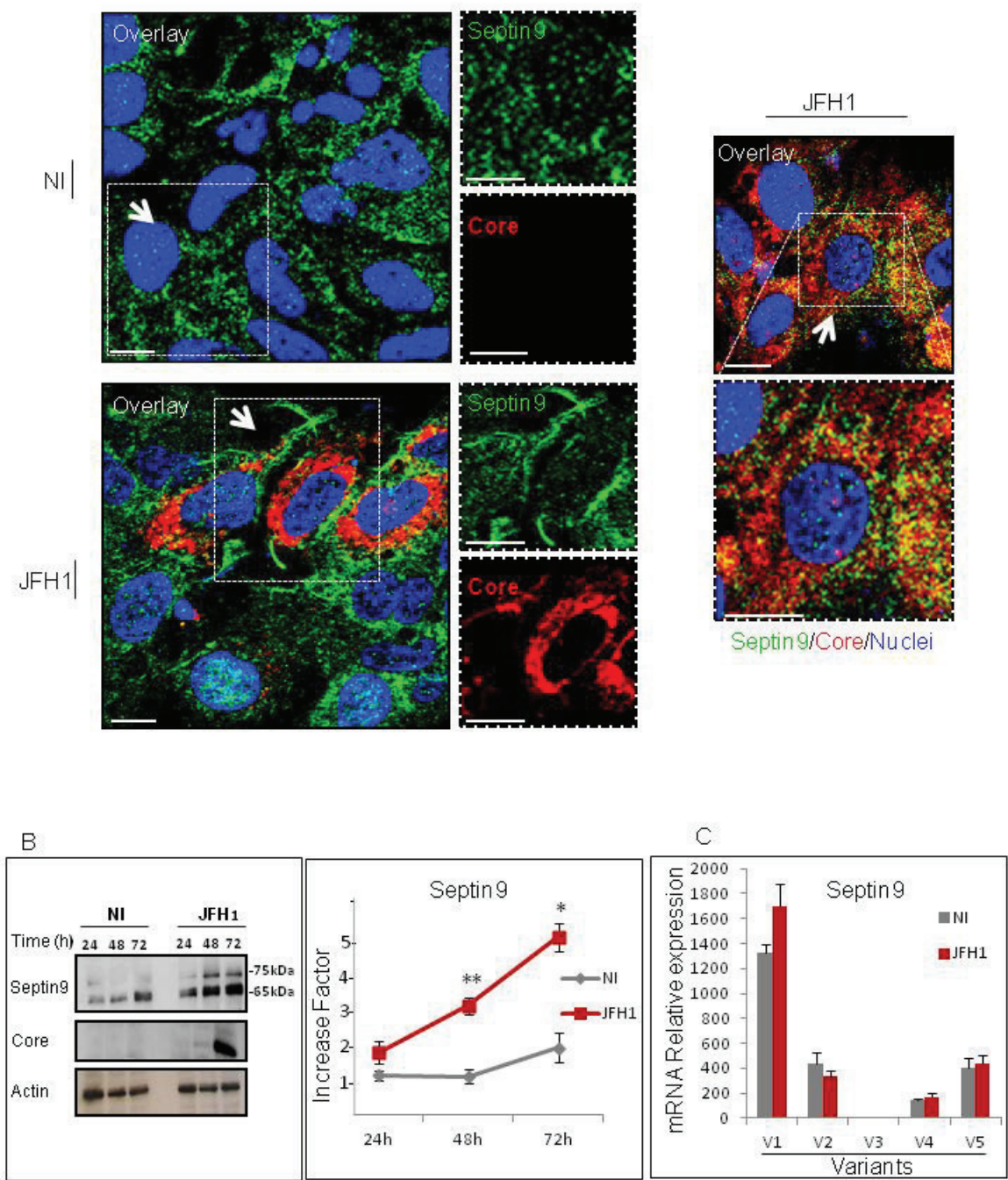
### **Supplementary Figure 7. Taxol blocked microtubules and induced formation of stronger septin 9\_V1 filaments**

Huh7R cells were transfected either with empty vector or with cDNA of septin 9\_V1. The later were also treated with Taxol for 3h and analyzed by confocal microscopy for septin 9\_V1 (green),  $\alpha$  tubulin (red) and nuclei (blue). Scale bar (10µm).

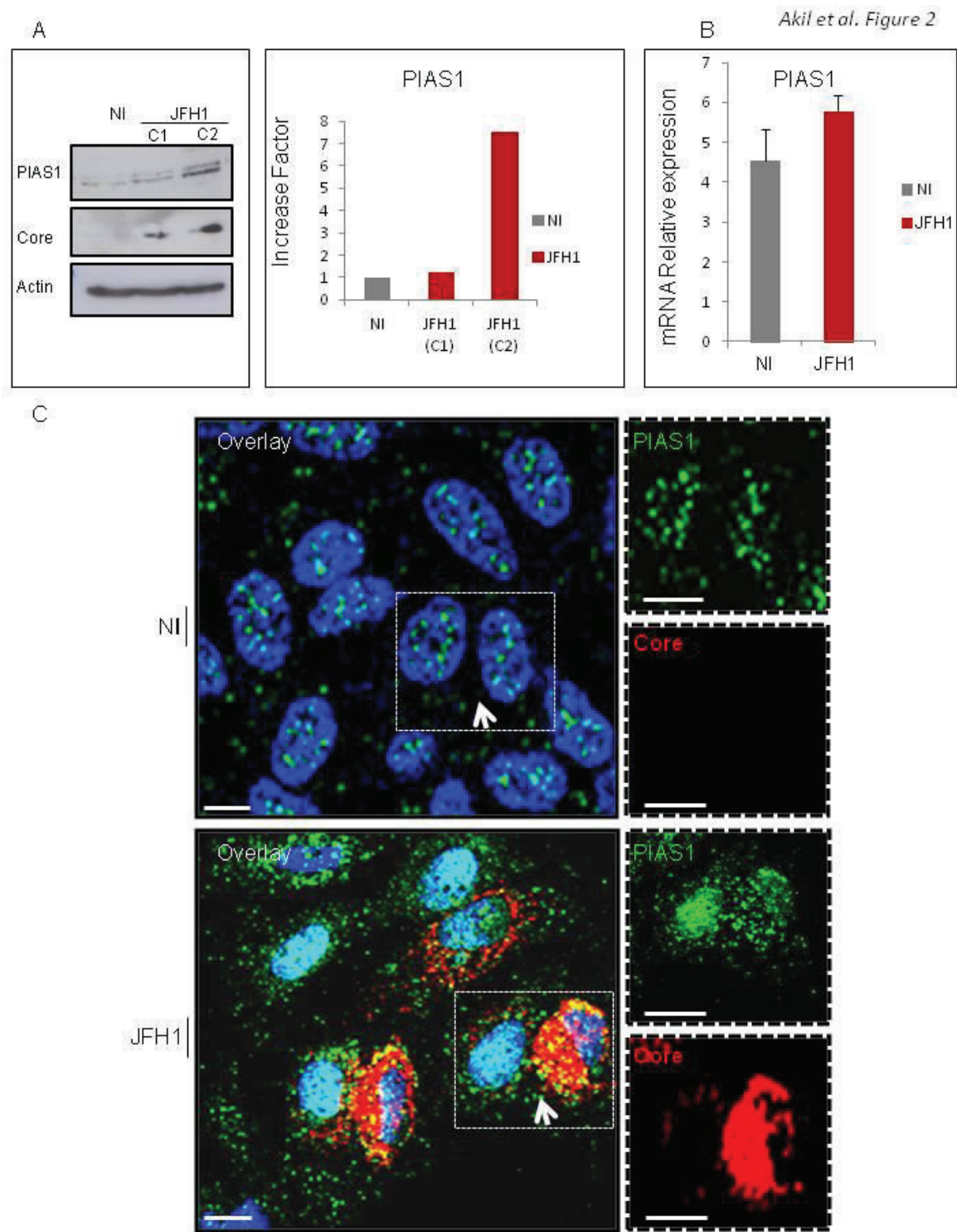


RESULTATS ET DISCUSSIONS

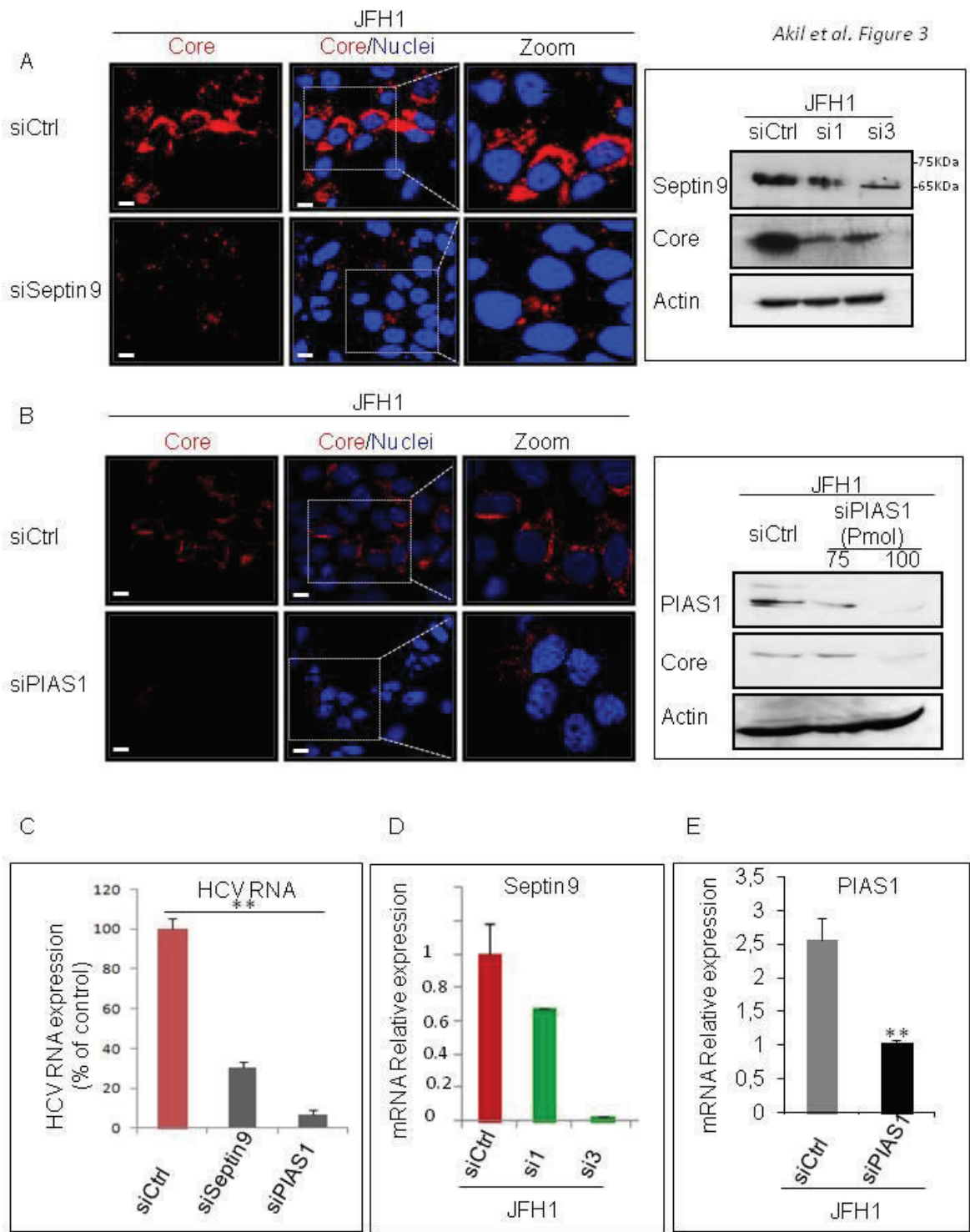
Akil et al. Figure 1



RESULTATS ET DISCUSSIONS

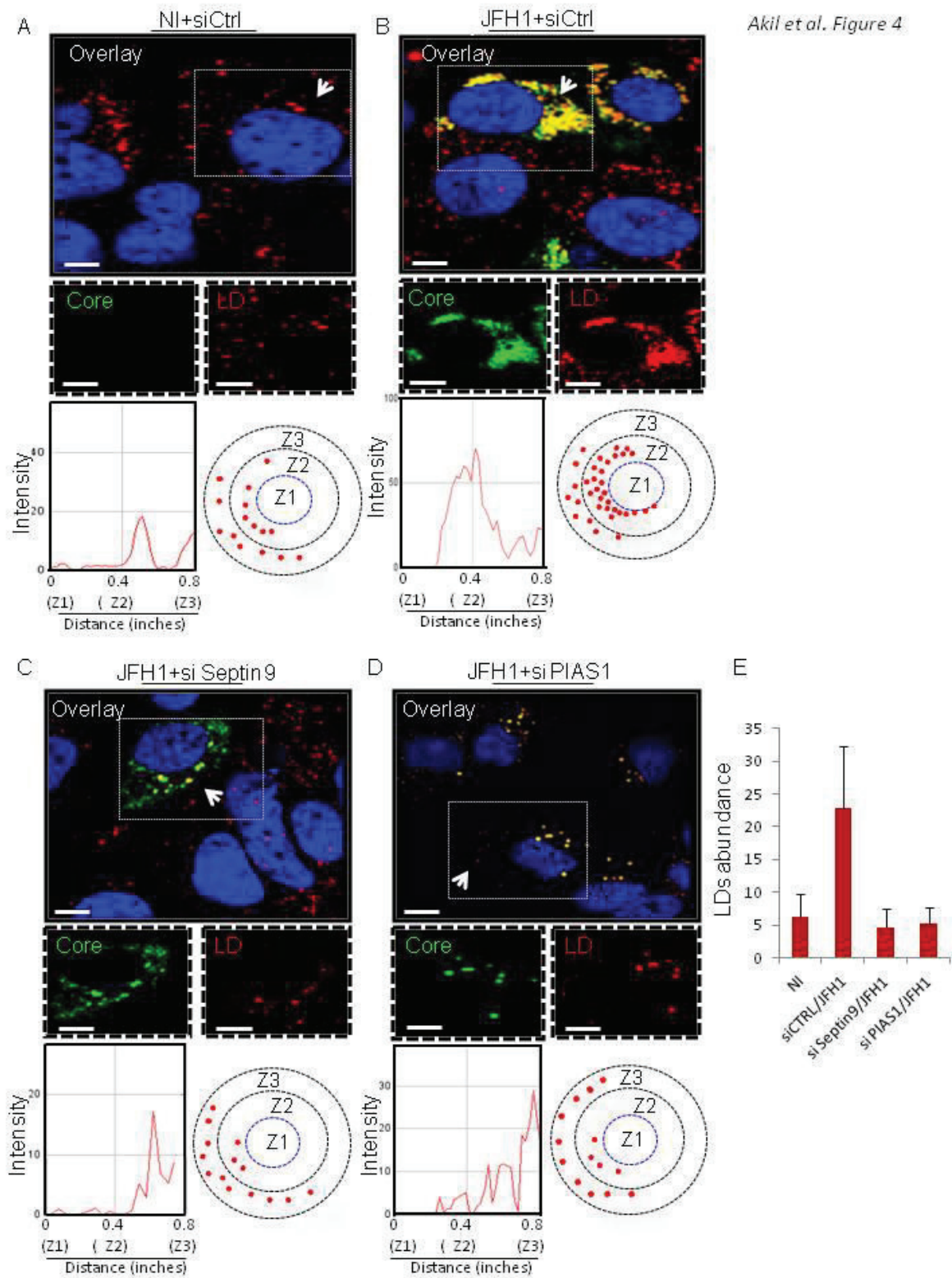


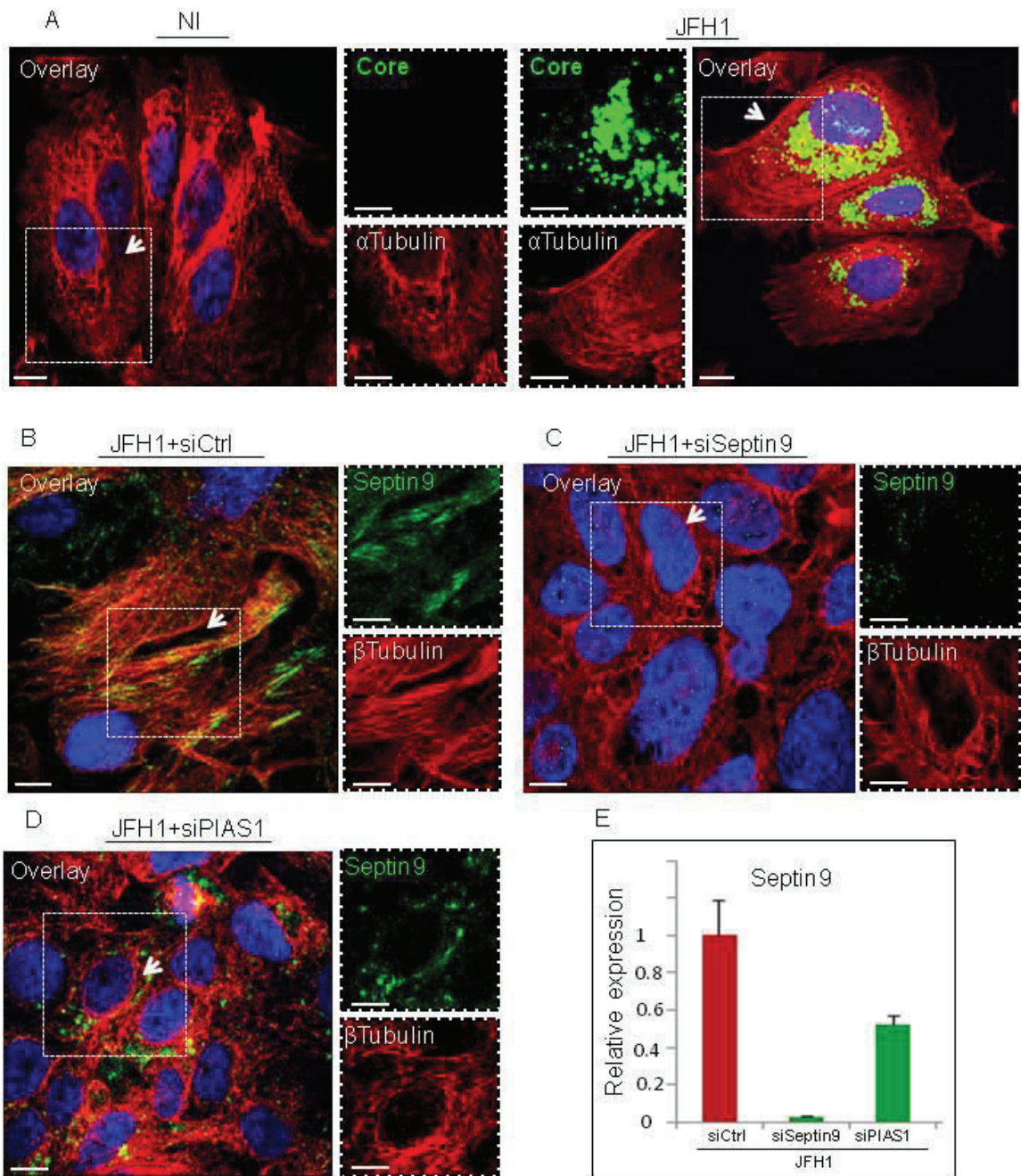
RESULTATS ET DISCUSSIONS



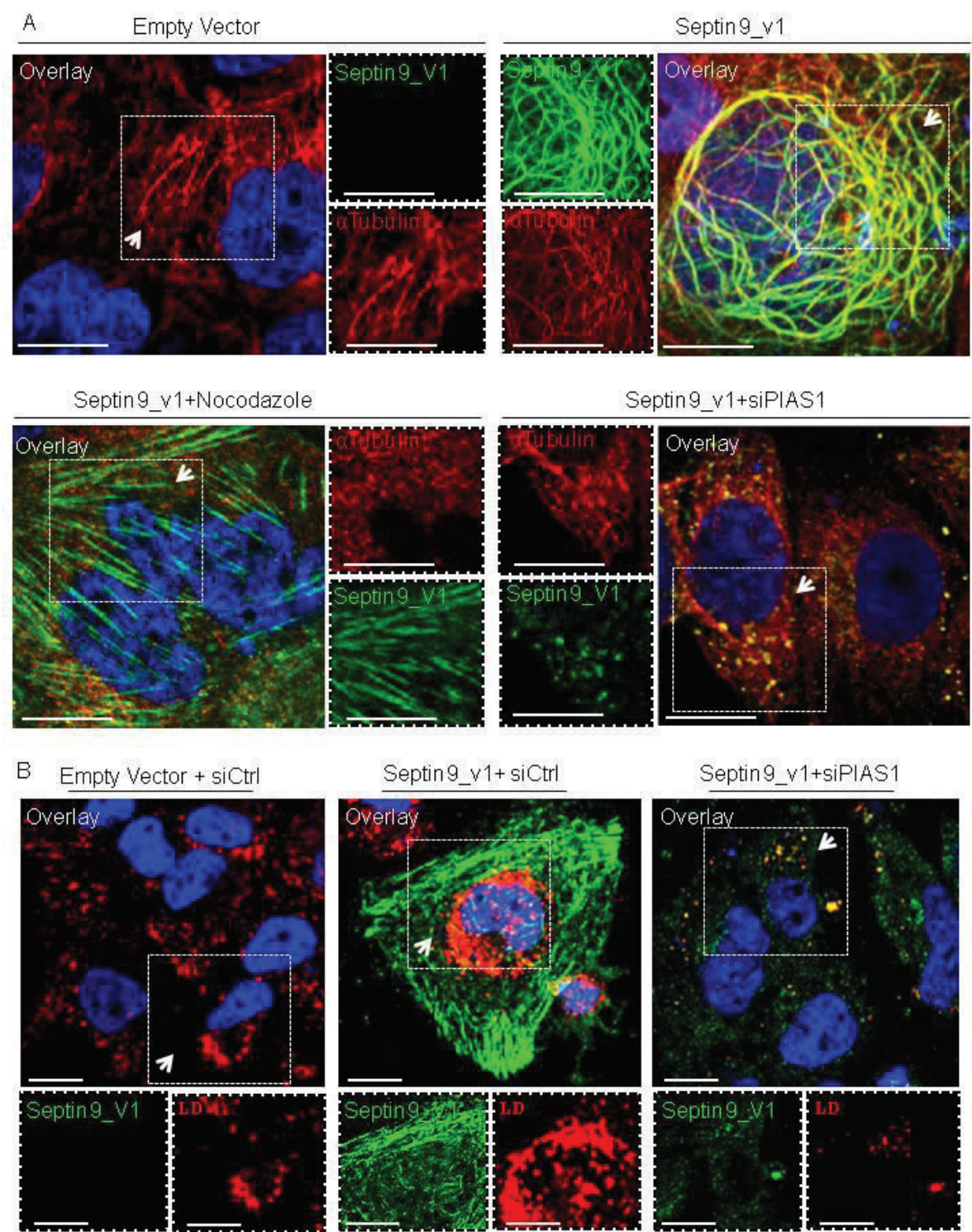


RESULTATS ET DISCUSSIONS









RESULTATS ET DISCUSSIONS

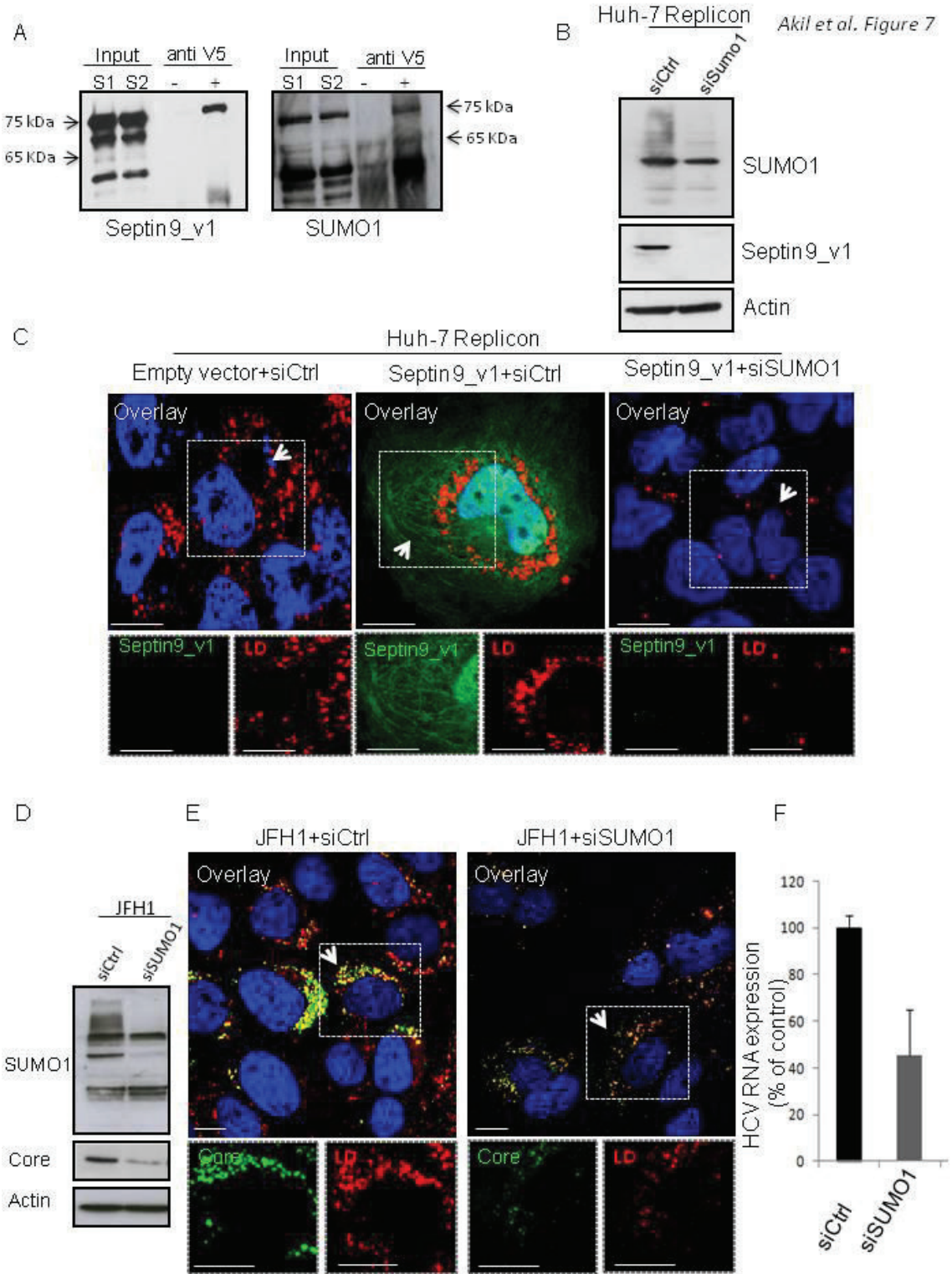
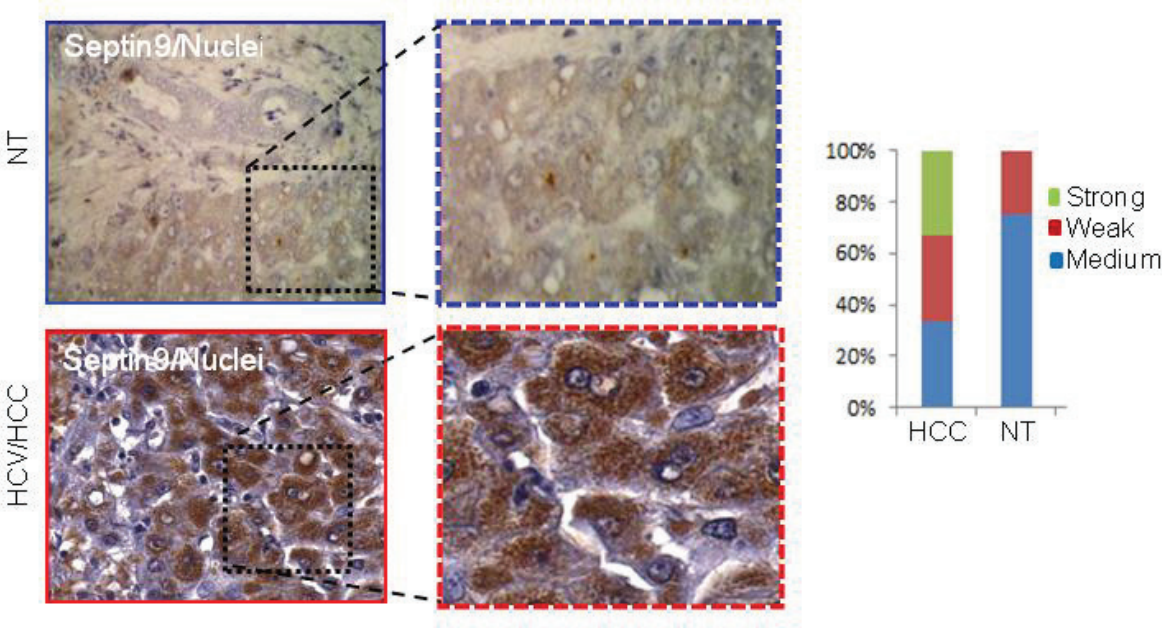




Figure S1

Supplementary Figure 1

A



B

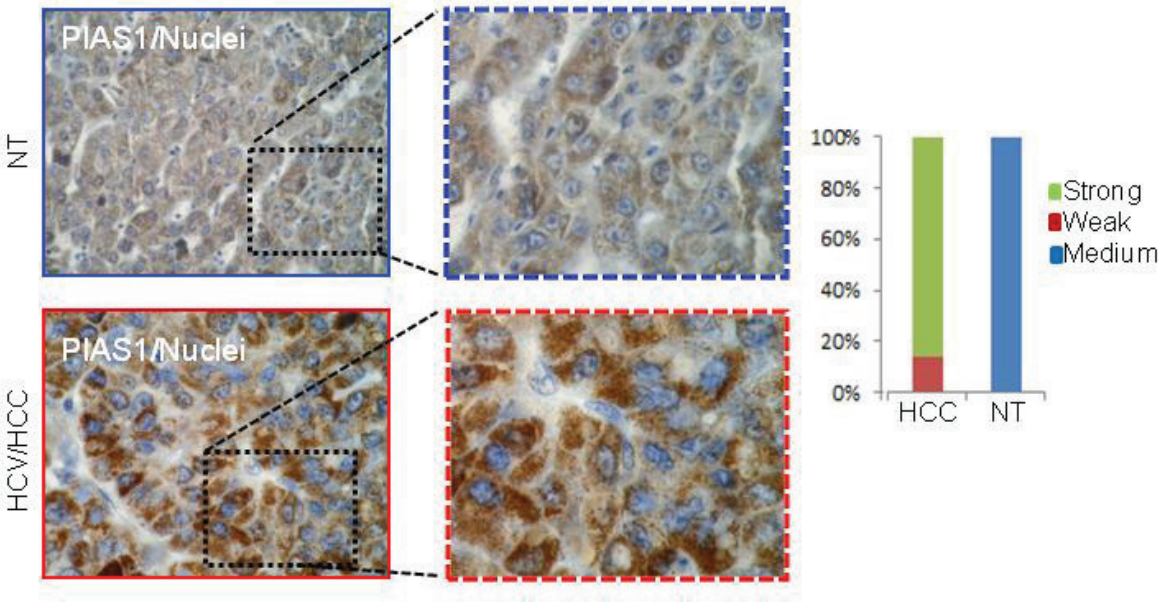




Figure S2

Supplementary Figure 2

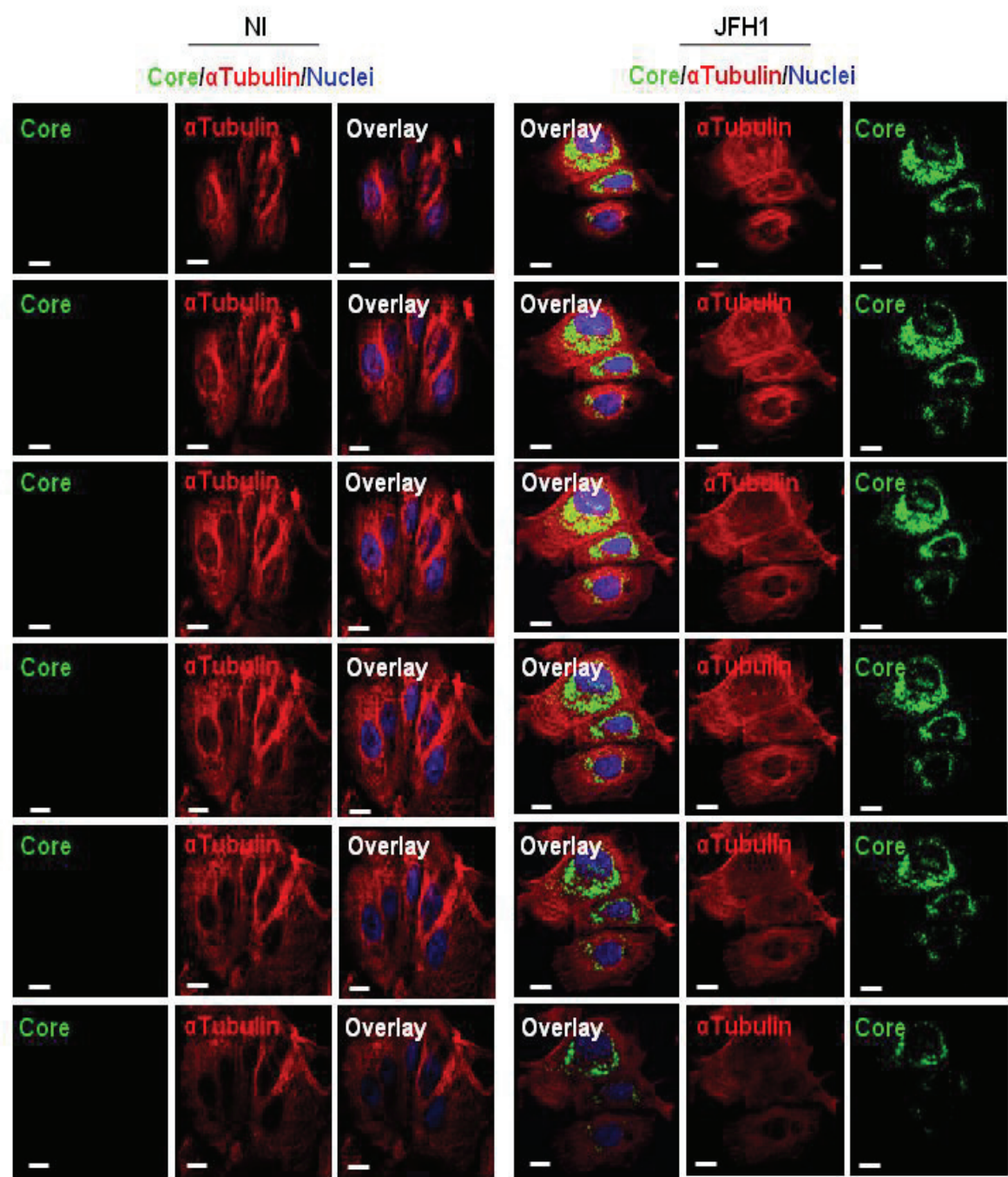


Figure S3

Supplementary Figure 3

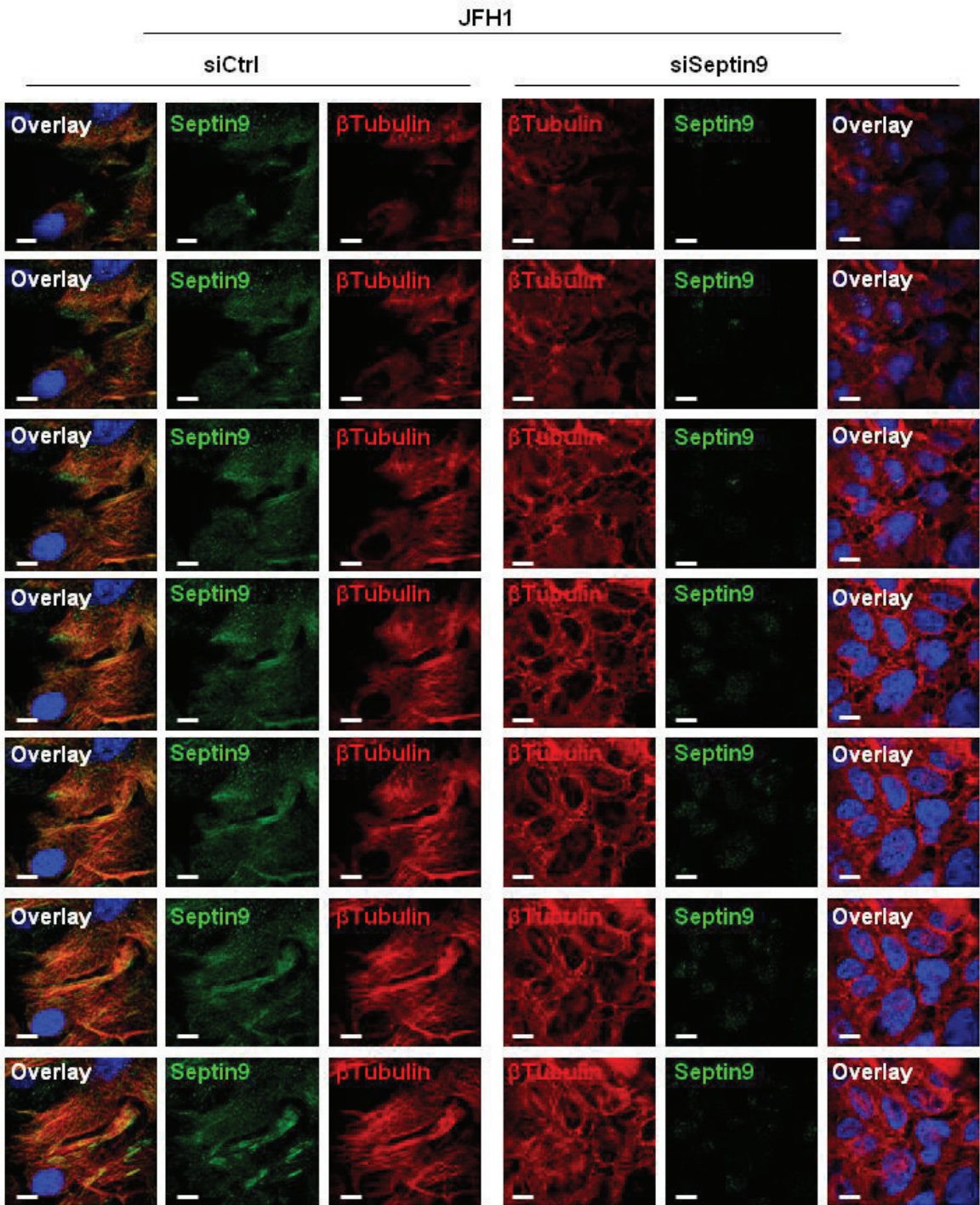
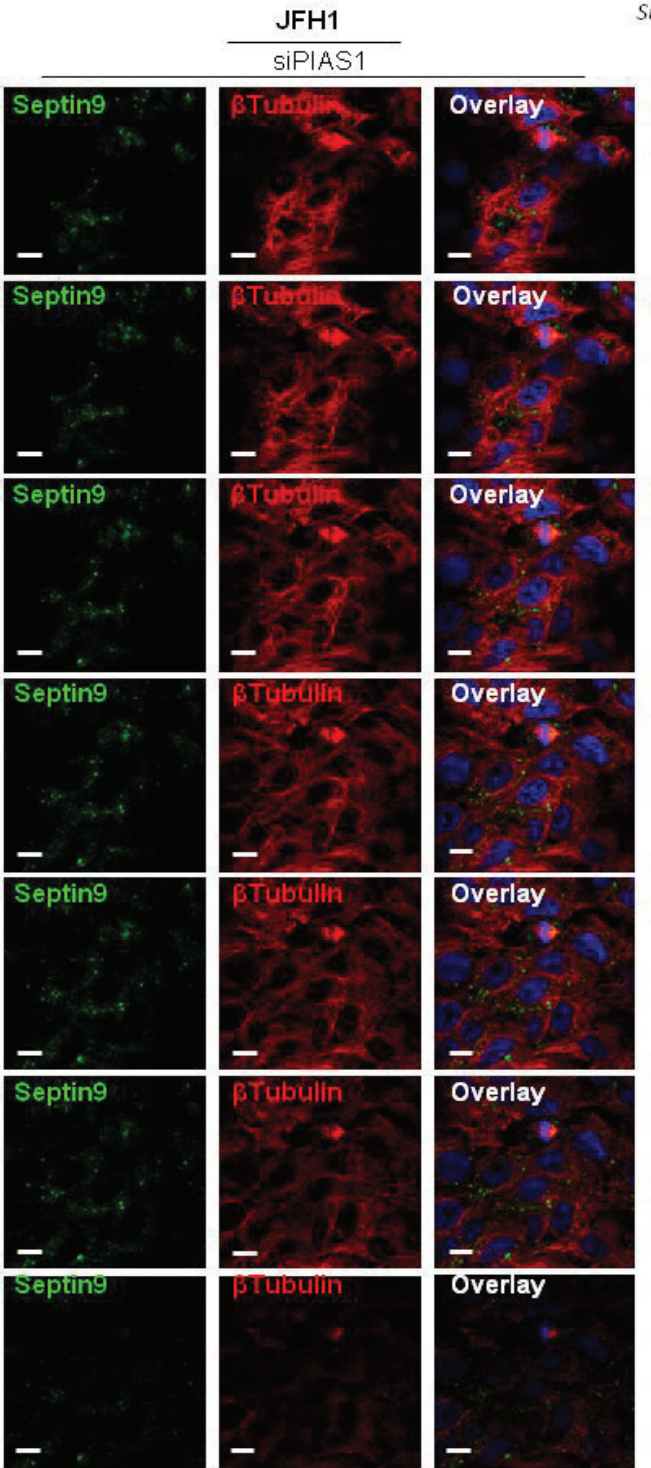


Figure S4

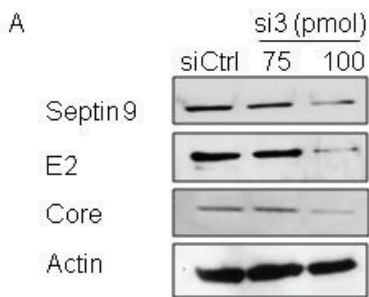
Supplementary Figure 4



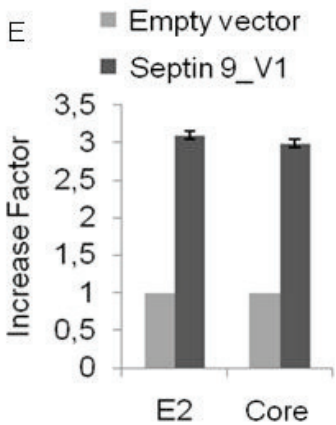
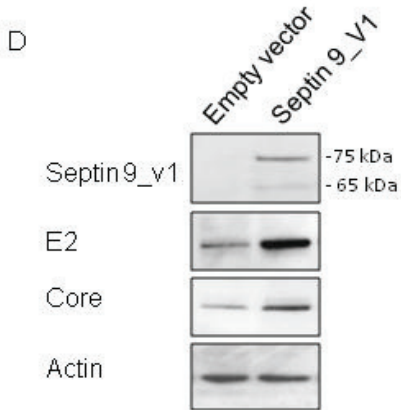
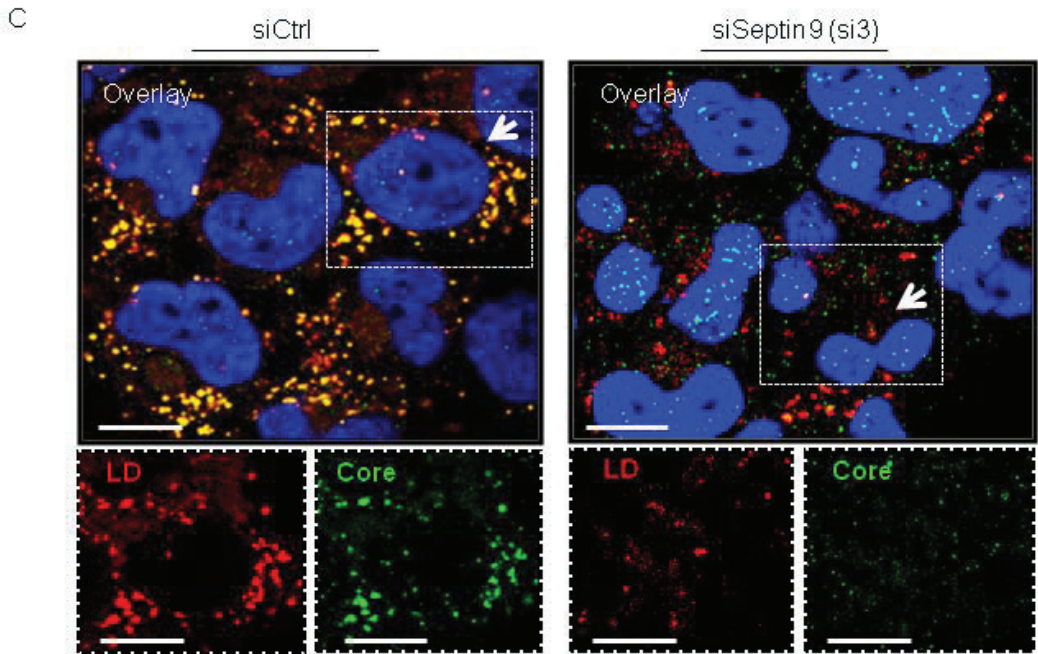
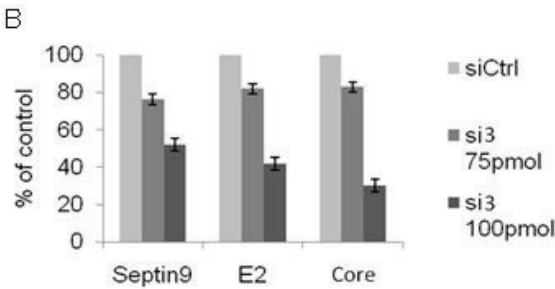


RESULTATS ET DISCUSSIONS

Figure S5



Supplementary Figure 5



## RESULTATS ET DISCUSSIONS

Figure S6

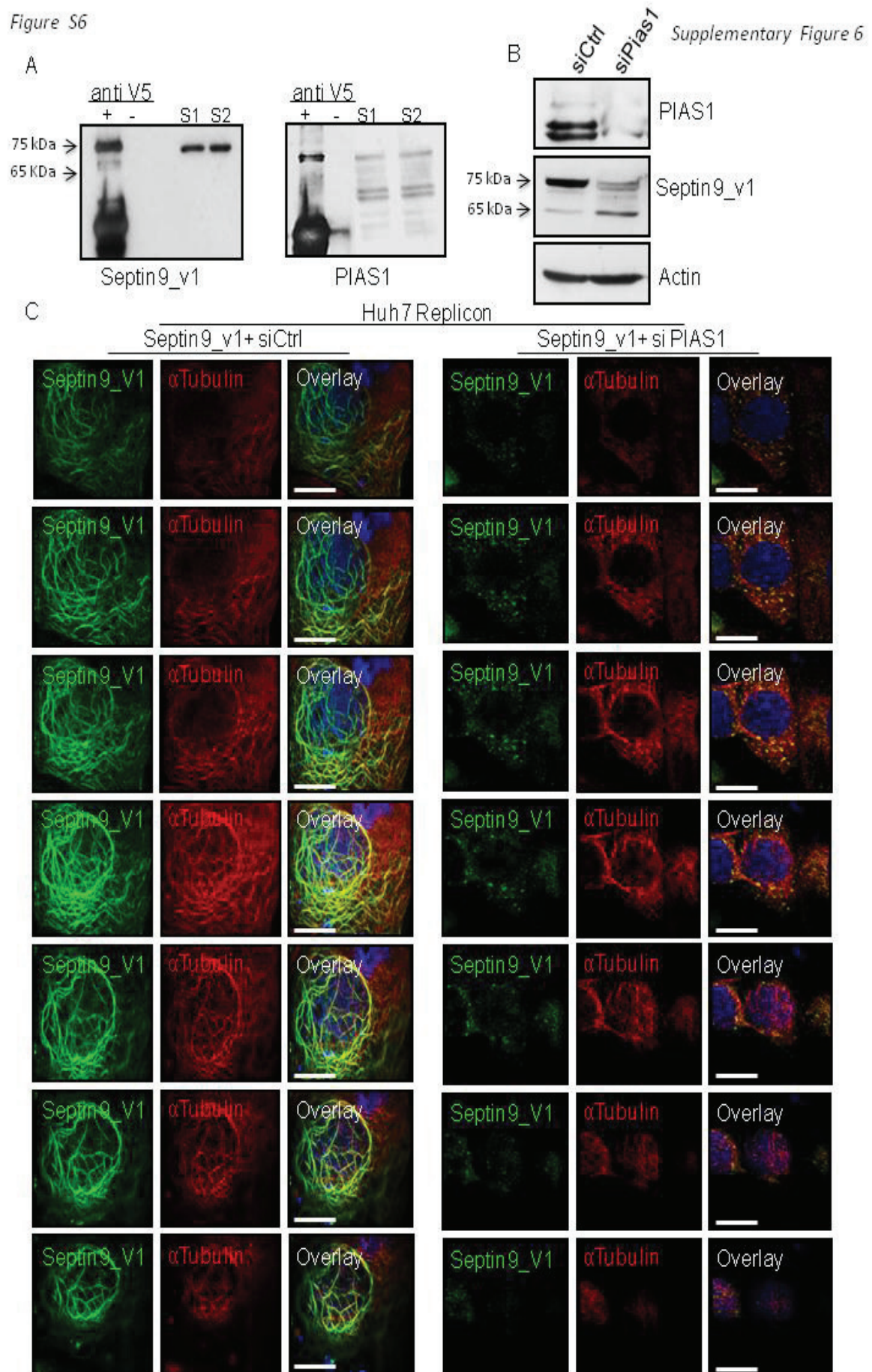
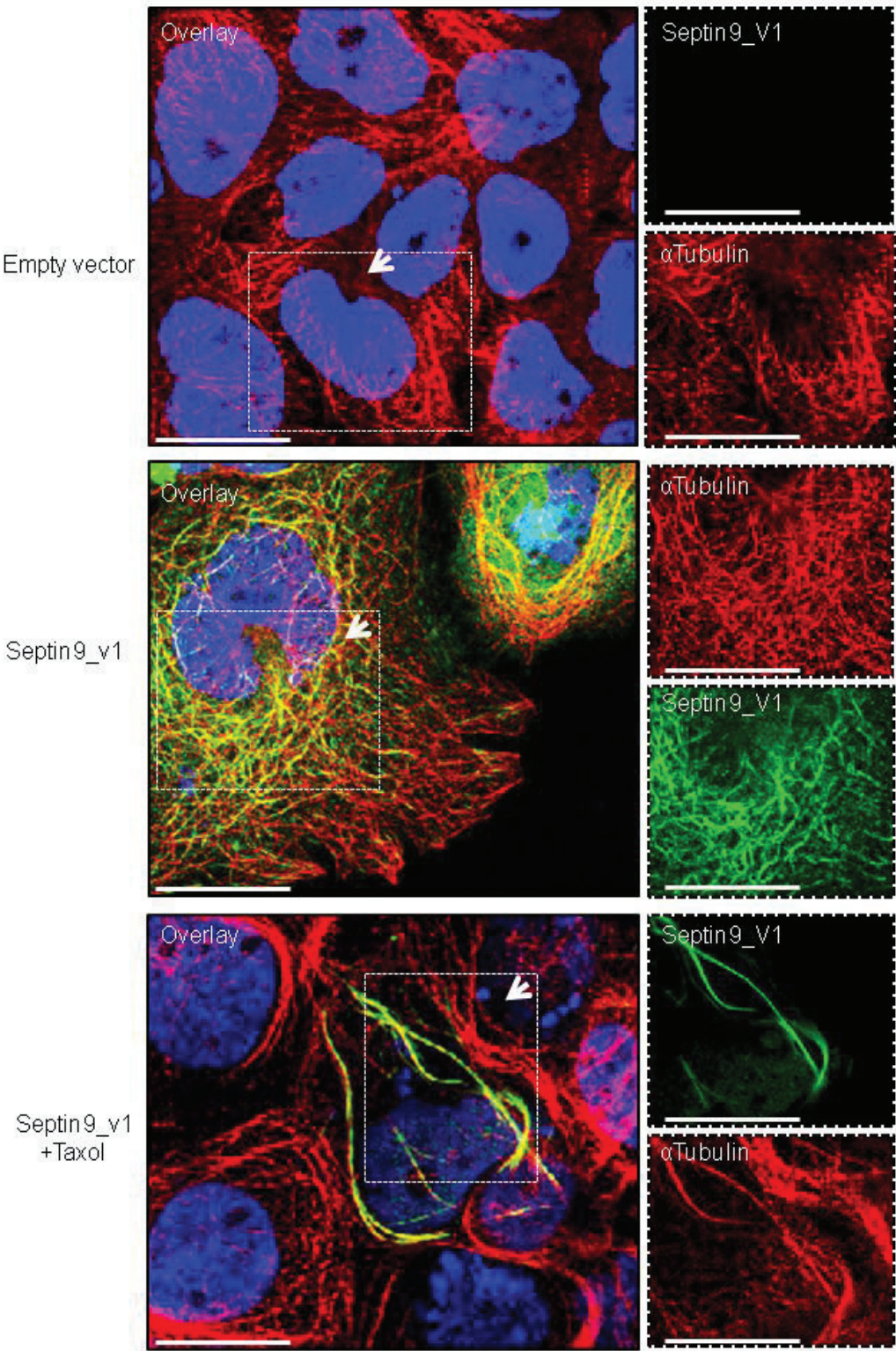




Figure S7

Supplementary Figure 7



## RESULTATS ET DISCUSSIONS

Table1

Primers for Q RT- PCR

| Gene                    | Forward<br>Sequence (5' to 3') | Reverse<br>Sequence (5' to 3') |
|-------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| <i>Septin9 variant1</i> | GAAGAAGTCTTACTCAGGAGGC         | CTCCTCGACCTCAAAAGATC           |
| <i>Septin9 variant2</i> | ATTCATTGAGCTGAGCCAGG           | AGTCCGAAATGATCCCATCC           |
| <i>Septin9 variant3</i> | ATGGAGAGGGACCGGATCTCA          | CTCGGAGTAGGGGAGTCTGG           |
| <i>Septin9 variant4</i> | GCTGGACTCTCTCGCTGACT           | CCTGGACAGAGACTGAAGCC           |
| <i>Septin9 variant5</i> | AGAGGCTCTCGGAGGAAGAG           | CCACCATGATGTTGAACT             |
| <i>hPIAS1</i>           | GGACCTGTCCTTCCCTATCTC          | TGGAGATGCTTGATGTGGAA           |
| <i>Septin9</i>          | GTCCACTGCTGCCTCTACTTCA         | GGACGATGTTGACCACCTTGCT         |
| <i>hG3PDH</i>           | AGCCACATCGCTCAGACAC            | GCCCAATACGACCAAATCC            |

## **RESULTATS ET DISCUSSIONS**

### **2. Discussion 2**

Au cours de ce travail, nous avons identifié, une surexpression de la septine9 chez des patients atteints de CHC et chroniquement infectés par le VHC. De plus, dans des hépatocytes infectés par le VHC, ce virus induit le recrutement en zone périnucléaire et la formation de structure filamenteuse de la septine9. Nous avons montré par la suite que la septine9 est impliquée dans la réplication du VHC et dans l'expression protéique des protéines virales.

Récemment, il a été montré *in vitro* dans des cellules infectées par le VHC que l'association de la capside du VHC aux GLs est liée à la production de ce virus et à l'accumulation des GLs en zone périnucléaire [319]. Cette étude suggérait aussi que l'accumulation et la localisation des GLs du cytoplasme vers les zones périnucléaires dépend du réseau de microtubules.

Un des objectifs de nos travaux était donc d'avancer dans la compréhension des mécanismes fondamentaux régissant la relocalisation de GL induites par la capside.

Dans un premier temps, il s'agissait de comparer la quantité et la localisation subcellulaire des GLs dans des cellules infectées par le VHC (JFH1) en présence et en absence de la septine9. De cette façon, nous avons montré que cette protéine était capable d'augmenter le nombre de GLs dans les cellules infectées. Néanmoins, la septine9 est importante à l'association des GLs avec la capside virale et la redistribution de GLs en zone périnucléaire. Notre étude a révélé ainsi que la septine9 module la redistribution de GLs et leur association avec la protéine de capside et contribue à établir l'environnement lipidique nécessaire pour la production virale, ceci est probablement dû à la capacité des septines à se lier aux phosphoinositides, composants présents à la surface des GLs [320].

Le réseau de microtubules, comme il a déjà été suggéré [319] pourrait avoir un rôle crucial dans la motilité des GL. De plus, la perturbation des microtubules réduit la sortie des particules virales [319]. Nos travaux ont ainsi amené à proposer que la redistribution des GLs au niveau périnucléaire dans les cellules infectées est dépendante des microtubules. Nos résultats ont montré que le VHC augmente la polymérisation des microtubules, et que ces derniers ont été trouvés en colocalisation avec les filaments de la septine9. Dans ce cadre, la déplétion de la septine9 dans des cellules infectées par le VHC a changé l'organisation du réseau de microtubules, suggérant que la septine9 participe à la polymérisation des microtubules induite par le VHC.



## **RESULTATS ET DISCUSSIONS**

Ce travail a également permis d'identifier la protéine PIAS1 et SUMO1 comme régulateurs de l'assemblage de la septine9 en filaments. Une étude a montrée, chez la levure, que les septines interagissent avec la protéine SUMO et que leur sumoylation peut être important pour leur assemblage en filaments [321]. Mais on sait très peu sur la sumoylation des septines chez les mammifères [322]. Ici nous avons fourni des données intéressantes sur la possible sumoylation de la septine9 par PIAS1. La déplétion de PIAS1 et SUMO1 par des siRNAs spécifiques diminue l'expression protéique de la septine 9 et désorganise sa structure filamenteuse. Nous avons aussi pu mettre en évidence, l'existence des interactions entre la septine 9 et les protéines PIAS1 et SUMO1. Chez La levure, les septines sont modifiées dans le compartiment cytoplasmique par l'E3 ligase Siz1 (l'homologue de PIAS1 chez les mammifères) [321]. Des études ont montré que Siz1 est principalement nucléaire, mais pendant la mitose une fraction de Siz1 se colocalise avec les septines dans le cytoplasme [321-323]. De même dans cette étude, PIAS1 se trouve principalement au niveau nucléaire dans des cellules non infectées, cependant après l'infection par le VHC une fraction importante de PIAS1 a été colocalisée avec la capsid virale dans le cytoplasme. Nous pensons que cette localisation de PIAS1 dans le cytoplasme, pourrait être déterminante des processus de sumoylation de la septine 9 et de réplication du VHC.

En conclusion, cette étude montre une nouvelle fonction de la septine 9 dans le cycle viral du VHC en s'associant aux lipides et aux microtubules et apporte aussi des nouvelles données fondamentales sur les caractéristiques structurelles et fonctionnelles de la septine 9. Sa fonction pourrait dépendre de sa modification post-traductionnelle (sumoylation) par PIAS1. Ces découvertes ont apporté des perspectives sur les mécanismes cellulaires exploitées par le VHC pour sa réplication, permettant la compréhension de la relation entre le VHC et son hôte et ouvrent des nouvelles voies thérapeutiques.

# CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

### **XIII. Conclusions et perspectives**

La carcinogenèse hépatique est en général le résultat d'un processus multi-étapes débutant avec l'exposition aux différents facteurs de risque, suivie du développement d'une hépatopathie chronique et d'une cirrhose. Le CHC est probablement l'une des tumeurs dont on connaît le mieux les agents étiologiques [312]. Il s'agit principalement de l'infection chronique par les virus des hépatites B et C (VHB et VHC), l'exposition à l'aflatoxine B1, la consommation excessive d'alcool, les maladies génétiques métaboliques comme l'hémochromatose, la stéatose hépatique non alcoolique (NASH). En effet, le caractère multifactoriel de l'hépatocarcinogenèse en rend la compréhension complexe et peu de gènes de prédisposition ont été décrits pour ces tumeurs [313]. Cependant, l'existence d'agrégations familiales de cas de CHC lié à l'infection virale B, le potentiel carcinogène de l'aflatoxine B1 qui varie en fonction des polymorphismes individuels pour la détoxification du métabolite mutagène de l'aflatoxine et l'existence de polymorphismes génétiques associés au développement de CHC chez les malades présentant une cirrhose d'origine alcoolique [314, 315] soulignent l'importance des interactions du type « gènes-environnement » dans les étapes précoces de la carcinogenèse hépatique. Mais l'identification de gènes de prédisposition au CHC reste quand même difficile, de par le nombre important des gènes impliqués, la variabilité de leurs implications et leurs interactions avec l'environnement.

Les objectifs de mes travaux de thèse en cotutelle portent essentiellement sur le carcinome hépatocellulaire (CHC) viro-induit ou non. L'objectif de la première partie de ma thèse a été d'identifier des facteurs de susceptibilité génétique au carcinome hépatocellulaire, par les approches « gène-candidat » et « cas-témoins ». Dans ce cadre, deux gènes candidats p300 et pcaf ont été sélectionnés en fonction de leur implication avec d'autres cancers et leurs fonctions. Ces approches, réalisées sur 94 patients atteints de CHC et 220 témoins, ont conduit à l'identification de deux SNPs de prédisposition, pouvant être impliqués dans l'étiologie du CHC : les génotypes Ile997Val du gène p300 et Asn386Ser du gène pcaf.

PCAF et p300 appartiennent à la famille des histones acétyltransférase (HATs). En plus de leur rôle en tant que co-activateurs transcriptionnels, ces deux protéines sont impliquées dans un grand nombre de fonctions biologiques telles que la prolifération, la régulation du cycle cellulaire, l'apoptose, la différenciation et la réponse aux dommages de l'ADN.

## **CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**

Dans notre population d'étude, une association significative a été observée entre le CHC et polymorphisme Ser386Ser du gène pcaf, de plus une autre association potentielle entre le polymorphisme Val997Val du gène p300 et le CHC est également observée.

A notre connaissance, notre investigation est la première faisant suspecter l'association de ces SNPs avec le carcinome hépatocellulaire. Cependant, l'étude combinée de ces deux polymorphismes avec l'autre facteur de risque viral, le VHC, n'a révélée aucune association entre ces variants prédisposant au CHC et l'infection par le VHC, ce qui a permis d'évaluer leur prédisposition génétique individuelle au CHC, et confirmé leur association directe à ce cancer, ouvrant des perspectives sur le plan de la prévention.

Il reste également à s'interroger sur le lien pathogénique entre les deux polymorphismes Val997Val et Ser386Ser et le carcinome hépatocellulaire. Nous n'avons malheureusement pas les moyens de vérifier par une étude fondamentale les effets fonctionnels de ces SNPs sur l'hépatocarcinogénèse. Malgré ça, pcaf et p300 semblent être potentiellement des gènes de prédisposition au carcinome hépatocellulaire, ce qui, aux vues de leur rôle en tant que co-activateurs transcriptionnels et de leur implication dans un grand nombre de fonctions biologiques pourrait expliquer l'augmentation du risque de développer un CHC chez les porteurs de ces génotypes. De plus en tant que co-activateurs ayant une activité histone acétyl transférase, une modification au niveau de leurs séquences pourrait avoir un impact fonctionnel sur la régulation transcriptionnelle en modifiant les histones.

Ce que nous avons présentés s'agit de résultats sur une petite cohorte de patients atteints de CHC. Cependant une cohorte plus importante, même sur une population différente permettrait de renforcer la validité des résultats et d'y vérifier l'association entre ces deux polymorphismes et le carcinome hépatocellulaire. Ce cancer représente à l'échelle mondiale la troisième cause de mortalité par cancer et son incidence est en constante augmentation dans le monde. C'est également l'un des rares cancers humains associés à des infections virales : environ 53% des cas sont associés à l'infection chronique par le virus de l'hépatite B, et plus de 25% des cas sont liés à l'infection chronique par le virus de l'hépatite C [296]. L'hépatite C chronique reste un facteur de risque majeur associée au développement d'une stéatose et d'une fibrose pouvant conduire à la cirrhose et au carcinome hépatocellulaire (CHC). Malgré l'importance des connaissances accumulées sur le VHC depuis 1989, une fraction importante de patients ne répond pas au traitement antiviral. Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires qui permettent l'établissement et le maintien d'une infection

## **CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**

persistante par le VHC devrait permettre le développement de nouvelles stratégies antivirales visant à l'éradication de l'infection virale et la prévention ou la régression des pathologies associées (stéatose, fibrose, CHC). L'identification de nouvelles modalités d'interaction du VHC avec sa cellule cible, l'hépatocyte est donc perçue comme nécessaire à l'amélioration des chances de succès thérapeutique.

La dernière partie des travaux de cette thèse en cotutelle entre l'Université Paris Sud 11 et l'Université Mohammed V Agdal vise à identifier et caractériser des facteurs cellulaires essentiels à la réplication du VHC, afin de définir de nouvelles cibles thérapeutiques. La réplication et la propagation du VHC dans les hépatocytes met en jeu des événements moléculaires impliquant des interactions dynamiques entre des composants viraux et cellulaires. Dans ce travail, nous avons pu identifier la septine 9 comme facteur cellulaire impliqué dans le cycle viral du VHC. Nous avons révélé que le VHC recrute et favorise l'assemblage de la septine 9 en filaments. De plus, nous avons pu montrer que la septine 9 module la redistribution de GLs et leur association avec la protéine de capsid et contribue à établir l'environnement lipidique nécessaire pour la production virale. Sachant que la redistribution des GLs au niveau périnucléaire dans les cellules exprimant la protéine core est dépendante des microtubules et que la perturbation de ces derniers réduit la sortie des particules virales [319]. Nos résultats ont montré que le VHC augmente la polymérisation des microtubules, et que ces derniers ont été trouvés en colocalisation avec les filaments de la septine9. Ainsi, notre étude a révélé que la déplétion de la septine9 dans des cellules infectées par le VHC a changé l'organisation du réseau de microtubules, suggérant que la septine 9 participe à la polymérisation des microtubules induite par le VHC.

En plus, nous avons pu identifier PIAS1 et SUMO1, comme protéines indispensables à la régulation de la septine9, à la production des protéines virales (core et E2) et à la réplication du VHC dans la cellule hôte. Nous avons aussi pu mettre en évidence, l'existence des interactions entre la septine9 et les protéines PIAS1 et SUMO1. En revanche, nous n'avons pas pu déterminer les domaines d'interaction entre la septine 9 et les protéines PIAS1 et SUMO1. Il serait donc, intéressant de faire des mutants pour définir ces domaines d'interaction. Dans cette étude, PIAS1 se trouve principalement au niveau nucléaire dans des cellules non infectées, cependant après l'infection par le VHC une fraction importante de PIAS1 a été colocalisée avec la protéine core du VHC dans le cytoplasme. Cette localisation de PIAS1 dans le cytoplasme, pourrait être déterminante des processus de sumoylation de la septine9 et de réplication du VHC.

## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

En conclusion, cette étude montre une nouvelle fonction de la septine 9 dans le cycle viral du VHC en s'associant aux lipides et aux microtubules. Sa fonction pourrait dépendre de sa modification post-traductionnelle (sumoylation) par PIAS1, montrant une fonction importante de PIAS1, au-delà de son action en tant qu'inhibiteur de STAT1. Ces résultats soulignent l'existence d'un lien fonctionnel entre la sumoylation de la septine9 et la réplication génomique du VHC. Nous émettons l'hypothèse que la fonction de la septine9 permettrait l'accumulation des GLs en zone périnucléaire et la polymérisation des microtubules nécessaires pour la production des particules virales infectieuses. L'identification d'autres effecteurs et régulateurs impliqués dans la réplication du VHC est une perspective intéressante. De tels facteurs pourraient représenter des cibles intéressantes dans la cadre de l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques.

*On manœuvre on tourne l'obstacle*

*(Maupassant)*

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUE



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

### *XIV. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES*

1. Di Bisceglie AM, Rustgi VK, Hoofnagle JM, Dusheiko GM, Lotze MT. Hepatocellular carcinoma. *Ann Intern Med* 1988;108:390-401
2. Labadie H, Seror O, Beaugrand M. Faut-il biopsier les petits nodules sur foie cirrhotique ? *Gastroenterol Clin Biol* 1999;23:640 -643.
3. Munoz N, Bosch X. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. In : *Neoplasms of the liver*, Okuda K., Ishak K. (eds). Springer Verlag, ed., Tokyo, 1987:3-19.
4. Saracci R, Repetto F. Time trends of primary liver cancer: indications of increased incidence in selected cancer registry populations. *J Natl Cancer Inst* 1980;65:241-247.
5. Okuda K, Fujimoto I, Hanai A, Urano Y. Changing incidence of hepatocellular carcinoma in Japan. *Cancer Res* 1987;47:4967-4972.
5. Kew MC, Popper H. Relationship between hepatocellular carcinoma and cirrhosis. *Semin. Liver Dis.* 1984;4:136-146.
6. Szmuness W. Hepatocellular carcinoma and the hepatitis B virus: evidence for a causal association. *Prog Med Virol* 1978;24:40-69.
7. Sherlock S. Liver disease in women. Alcohol, autoimmunity, and gallstones. *West J Med.* 1988 Dec;149(6):683-6. Review.
8. Bartosch B, Dubuisson J, Cosset FL (2003) Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J Exp Med* 197(5): 633-642.
9. Voigt MD. Alcohol in hepatocellular cancer. *Clin Liver Dis.* 2005;9:151-69
10. Di Bisceglie AM, Carithers RL Jr, Gores GJ. Hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1998; 28:1161-1165.
11. Law M, Maruyama T, Lewis J, Giang E, Tarr AW, Stamataki Z, Gastaminza P, Chisari FV, Jones IM, Fox RI, Ball JK, McKeating JA, Kneteman NM, Burton DR (2008) Broadly neutralizing antibodies protect against hepatitis C virus quasispecies challenge. *Nat Med* 14(1): 25-27.
12. El-Serag DB, Tran T, Everhart JE. Diabetes increases the risk of chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004; 126: 460-8.
13. Deugnier Y, Loréal O, TurUn B, et al. Liver pathology in genetic hemochromatosis: a review of 135 homozygous cases and their bio-clinical correlations. *Gastroenterology* 1992; 102:2050-9.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

14. Kowdley KY. Iron, hemochromatosis, and hepatocellular carcinoma *Gastroenterology* 2004;127:879-86.
15. Cha C, Dematteo RP. Molecular mechanisms in hepatocellular carcinoma development. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2005 ; 19: 25-37.
16. Yu MW, Chiu YH, Yang SY et al. Cytochrome P450 1A1 Genetic Polymorphisms and Risk of Hepatocellular Carcinoma among Chronic Hepatitis B Carriers" *Br J Cancer*, 1999, 80, 598-603).
17. Caldwell SH, Crespo DM, Kang HS, AI-Osaimi AM. Obesity and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004; 127: 897-103.
18. El-Serag DB, Tran T, Everhart JE. Diabetes increases the risk of chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004; 126: 460-8.
19. Jemal A, Clegg LX, Ward E, Ries LA, Wu X, Jamison PM, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2001, with a special feature regarding survival. *Cancer* 2004 ; 101 : 3-27.
20. N'Kontehou G, Tin Tin Htar M, Pariès J, Costentin L, Ganne-Carrié N, Grando Lemaire V, et al. Overweight and diabetes as risk factors for hepatocellular carcinoma in patients with alcoholic or viral C cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006
19. Jemal A, Clegg LX, Ward E, Ries LA, Wu X, Jamison PM, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2001, with a special feature regarding survival. *Cancer* 2004 ; 101 : 3-27.
20. N'Kontehou G, Tin Tin Htar M, Pariès J, Costentin L, Ganne-Carrié N, Grando Lemaire V, et al. Overweight and diabetes as risk factors for hepatocellular carcinoma in patients with alcoholic or viral C cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006
16. Di Bisceglie AM, Lyra AC, Schwartz M, Reddy RK, Martin P, Gores G, et al. Hepatitis C-related hepatocellular carcinoma in the United States: influence of ethnic status. *Am J Gastroenterol* 2003 ; 98 : 2060-3.
17. Bugianesi E, Leone N, Vanni E, Marchesini G, Brunello F, Carucci P, et al. Expanding the natural history of nonalcoholic steatohepatitis : from cryptogenic cirrhosis to hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2002; 123: 134-40.
18. Sanyal AJ, Banas C, Sargeant C, Luketic VA, Sterling RK, Stravitz RT, et al. Similarities and differences in outcomes of cirrhosis due to nonalcoholic steatohepatitis and Hepatitis C. *Hepatology* 2006; 43 : 682-9.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

19. Fattovich G, Stroffolini T, Zagni I, Donato F. Hepatocellular carcinoma in cirrhosis : incidence and risk factors. *Gastroenterology* 2004; 127: S35-50.
20. Sherman M. Hepatocellular carcinoma : epidemiology, risk factors, and screening. *Semin Liver Dis* 2005; 25 : 143-54.
21. Fattovich G, Stroffolini T, Zagni I, Donato F. Hepatocellular carcinoma in cirrhosis : incidence and risk factors. *Gastroenterology* 2004; 127: S35-50.
22. Mc Glynn KA, London WT. Epidemiology and natural history of hepatocellular carcinoma. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2005; 19: 3-23.
23. Sherman M. Hepatocellular carcinoma : epidemiology, risk factors, and screening. *Semin Liver Dis* 2005; 25 : 143-54.
24. Balsara BR, Pei J, De Rienzo A, Simon D, Tosolini A, Lu YY, et al. Human hepatocellular carcinoma is characterized by a highly consistent pattern of genomic imbalances, including frequent loss of 16q23.1-24.1. *Genes Chromosomes Cancer* 2001;30:245-53.
25. Marchio A, Meddeb M, Pineau P, Danglot G, Tiollais P, Bernheim A, et al. Recurrent chromosomal abnormalities in hepatocellular carcinoma detected by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 1997;18:59-65.
26. Guan XY, Fang Y, Sham JS, Kwong DL, Zhang Y, Liang Q, et al. Recurrent chromosome alterations in hepatocellular carcinoma detected by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 2000;29:110-6.
27. Wong N, Lai P, Pang E, Fung LF, Sheng Z, Wong V, et al. Genomic aberrations in human hepatocellular carcinomas of differing etiologies. *Clin Cancer Res* 2000;6:4000-9.
28. Slagle BL, Zhou YZ, Butel JS. Hepatitis B virus integration event in human chromosome 17p near the p53 gene identifies the region of the chromosome commonly deleted in virus-positive hepatocellular carcinomas. *Cancer Res* 1991;51:49-54.
29. Hsu HC, Peng SY, Lai PL, Sheu JC, Chen DS, Lin LI, et al. Allelotype and loss of heterozygosity of p53 in primary and recurrent hepatocellular carcinomas. A study of 150 patients. *Cancer* 1994;73:42-7.
30. Nose H, Imazeki F, Ohto M, Omata M. p53 gene mutations and 17p allelic deletions in hepatocellular carcinoma from Japan. *Cancer* 1993;72:355-60.
31. de La Coste A, Romagnolo B, Billuart P, Renard CA, Buendia MA, Soubrane O, et al. Somatic mutations of the beta-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:8847-51.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

32. Miyoshi Y, Iwao K, Nagasawa Y, Aihara T, Sasaki Y, Imaoka S, et al. Activation of the beta-catenin gene in primary hepatocellular carcinomas by somatic alterations involving exon 3. *Cancer Res* 1998;58:2524-7.
33. Yakicier MC, Irmak MB, Romano A, Kew M, Ozturk M. Smad2 and Smad4 gene mutations in hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 1999;18:4879-83.
34. Zhang XK, Huang DP, Qiu DK, Chiu JF. The expression of c-myc and c-N-ras in human cirrhotic livers, hepatocellular carcinomas and liver tissue surrounding the tumors. *Oncogene* 1990;5:909-14.
35. Tiniakos D, Spandidos DA, Yiagnisis M, Tiniakos G. Expression of ras and c-myc oncoproteins and hepatitis B surface antigen in human liver disease. *Hepatogastroenterology* 1993;40:37-40.
36. Yoshikawa H, Matsubara K, Qian GS, Jackson P, Groopman JD, Manning JE, et al. SOCS-1, a negative regulator of the JAK/STAT pathway, is silenced by methylation in human hepatocellular carcinoma and shows growth-suppression activity. *Nat Genet* 2001;28:29-35.
37. Smela ME, Currier SS, Bailey EA, Essigmann JM. The chemistry and biology of aflatoxin B(1) : from mutational spectrometry to carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2001;22:535-45.38. Frazer KA, Eskin E, Kang HM, Bogue MA, Hinds DA, Beilharz EJ, Gupta RV, Montgomery J, Morenzoni MM, Nilsen GB, Pethiyagoda CL, Stuve LL, Johnson FM, Daly MJ, Wade CM, Cox DR. A sequence-based variation map of 8.27 million SNPs in inbred mouse strains. *Nature*. 2007 Aug 30;448(7157):1050-3.
39. Kidd JM, Cooper GM, Donahue WF, Hayden HS et al. Mapping and sequencing of structural variation from eight human genomes. *Nature*. 2008 May 1;453(7191):56-64.
40. Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, Zabner J, Kline JN, Jones M, Frees K, Watt JL, Schwartz DA. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet*. 2000 Jun;25(2):187-91.
41. Ducloux D, Deschamps M, Yannaraki M, Ferrand C, Bamoulid J, Saas P, Kazory A, Chalopin JM, Tiberghien P. Relevance of Toll-like receptor-4 polymorphisms in renal transplantation. *Kidney Int*. 2005 Jun; 67(6):2454-61.
42. Bochud PY, Hersberger M, Taffé P, Bochud M, Stein CM, Rodrigues SD, Calandra T, Francioli P, Telenti A, Speck RF, Aderem A; Swiss HIV Cohort Study. Polymorphisms in Toll-like receptor 9 influence the clinical course of HIV-1 infection. *AIDS*. 2007 Feb 19;21(4):441-6.
43. El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology*. 2007 Jun;132(7):2557-76. Review.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

44. Maupas P, Werner B, Larouzé B, Millman I, London WT, O'Connell A, Blumberg BS. Antibody to hepatitis-B core antigen in patients with primary hepatic carcinoma. *Lancet*. 1975 Jul 5;2(7923):9-11.
45. Liang TJ, Jeffers LJ, K.R. R, De Medina M, Parker IT, Cheinquer H, et al. Viral pathogenesis of hepatocellular carcinoma in the United States. *Hepatology* 1993;18:1326-1333.
46. Ruiz J, Sangro B, Cuende JI, Belouqui O, Riezu-Boj JI, Herrero JI, et al. Hepatitis B and C viral infections in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1992; 16:637-641.
47. Paterlini P, Driss F, Pisi E, Franco D, Berthelot P, Bréchet C. Persistence of hepatitis B and hepatitis C viral genomes in primary liver cancers from HBsAg negative patients : a study of a low endemic area. *Hepatology* 1993;17:20-29.
48. Su Q, Schroder C, Hofmann W, Otto G, Pichlmayr R, Bannasch P. Expression of hepatitis B virus X protein in HBVinfected human livers and hepatocellular carcinomas. *Hepatology* 1998;27:1109-11020.
49. Sheu J-C, Huang G-T, Shih L-N, Lee W-C, Chou H-C, Wang J-T, et al. Hepatitis C and B viruses in hepatitis B surface antigen-negative hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 1992;103:1322-1327.
50. Feitelson MA. Biology of disease: Biology of hepatitis B virus variants. *Lab Invest* 1994;71:324-349.
51. Ikeda K, Saitoh S, Koida I, Arase Y, Tsubota A, Chayama K, et al. A multivariate analysis of risk factors for hepatocellular carcinogenesis : a prospective observation of 795 patients with viral and alcoholic cirrhosis. *Hepatology* 1993; 18:47-53.
52. Blum HE. Variants of hepatitis B, C and D viruses: molecular biology and clinical significance. *Digestion* 1995;56:85-95.
53. DE Mitri MS, Poussin K & Baccarini P - VHC associated liver cancer without cirrhosis. *Lancet*, 1995, 345, 413-415
54. Zarsky JP, Lunel F, Dardelet D,- Hepatitis C virus and hepatocellular carcinoma in France : Detection of antibodies using two second generation assays. *J Hepatol*, 1991, 12, 402-405.
55. Bastie A, Powlotsky JM, Roudt TF & Dhumeau D -Infection par le virus de l'hépatite C, épidémiologie. *Pathol Biol*, 1995, 43, 674-680
56. Di Bisceglie AM, Order SE, Klein JL, Waggoner JG, Sjogren MH, Kuo G, Houghton M, Choo QL, Hoofnagle JH. The role of chronic viral hepatitis in hepatocellular carcinoma in the United States. *Am J Gastroenterol*. 1991 Mar;86(3):335-8.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

57. Poynard T, Aubert A, Lazizi Y, Bedossa P, Hamelin B, Terris B, Naveau S, Dubreuil P, Pillot J, Chaput JC. Independent risk factors for hepatocellular carcinoma in French drinkers. *Hepatology*. 1991 May;13(5):896-901.
58. Brahm J, Fagan E. Non-A, non-B hepatitis: more than 10 years of research. *Rev Med Chil*. 1987 Mar; 115(3):248-52. Review.
59. Feinstone, S. M., A. Z. Kapikian, et al. (1975). «Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. » *N Engl J Med* 292(15): 767-70.
60. Alter, H. J., R. H. Purcell, et al. (1978). «Transmissible agent in non-A, non-B hepatitis.» *Lancet* 1(8062): 459-63.
61. Choo, Q. L., G. Kuo, et al. (1989). «Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome.» *Science* 244(4902): 359-62.
62. Tsukiyama-Kohara, K., Iizuka, N., Kohara, M., and Nomoto, A. (1992). Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *Journal of virology* 66, 1476-1483.
63. Lohmann V, Roos A, Korner F, Koch JO, Bartenschlager R. Biochemical and structural analysis of the NS5B RNA-dependent RNA polymerase of the hepatitis C virus. *J Viral Hepat* 2000 May;7(3):167-174.
64. Forton, D. M., P. Karayiannis, et al. (2004). «Identification of unique hepatitis C virus quasispecies in the central nervous system and comparative analysis of internal translational efficiency of brain, liver, and serum variants.» *J Virol* 78(10): 5170-83.
65. Gravitz, L. (2011). Introduction: A smouldering public-health crisis. *Nature* 474, S2-S4.
66. Popescu, C.-I., Callens, N., Trinel, D., Roingeard, P., Moradpour, D., Descamps, V., Duverlie, G., Penin, F., Hélot, L., Rouille, Dubuisson J. (2011). NS2 Protein of Hepatitis C Virus Interacts with Structural and Non-Structural Proteins towards Virus Assembly. *PLoS Pathog* 7, e1001278.
67. Shepard CW, Finelli L, Alter MJ. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis*. 2005 Sep;5(9):558-67. Review.
68. Alter, H. J. (2005). "HCV natural history: the retrospective and prospective in perspective." *J Hepatol* 43(4): 550-2.
69. Hijikata, M., Y. K. Shimizu, et al. (1993). "Equilibrium centrifugation studies of hepatitis C virus: evidence for circulating immune complexes." *J Virol* 67(4): 1953-8.
70. Kanto, T., N. Hayashi, et al. (1994). "Buoyant density of hepatitis C virus recovered from infected hosts: two different features in sucrose equilibrium density-gradient centrifugation related to degree of liver inflammation." *Hepatology* 19(2): 296-302.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

71. Agnello, V., G. Abel, et al. (1999). "Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(22): 12766-71.
72. Andre, P., F. Komurian-Pradel, et al. (2002). «Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles.» *J Virol* 76(14): 6919-28.
73. Diaz, O., F. Delers, et al. (2006). "Preferential association of Hepatitis C virus with apolipoprotein B48-containing lipoproteins." *J Gen Virol* 87(Pt 10): 2983-91.
74. Tsukiyama-Kohara K, Izuka N, Kohara M, Nomoto A. Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *J Virol* 1992 Mar;66(3):1476-1483.
75. Jopling, C.L., Norman, K.L., and Sarnow, P. (2006). Positive and negative modulation of viral and cellular mRNAs by liver-specific microRNA miR-122. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 71, 369-376.
76. Reynolds JE, Kaminski A, Kettinen HJ, Grace K, Clarke BE, Carroll AR, Rowlands DJ, Jackson RJ. Unique features of internal initiation of hepatitis C virus RNA translation. *Embo J* 1995 Dec 1;14(23):6010-6020.
77. Fraser, C. S. and J. A. Doudna (2007). "Structural and mechanistic insights into hepatitis C viral translation initiation." *Nat Rev Microbiol* 5(1): 29-38.
78. Barria, M. I., A. Gonzalez, et al. (2009). "Analysis of natural variants of the hepatitis C virus internal ribosome entry site reveals that primary sequence plays a key role in capindependent translation." *Nucleic Acids Res* 37(3): 957-71.
79. Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, Wolk B, Tellinghuisen TL, Liu CC, Maruyama T, Hynes RO, Burton DR, Mckeating JA, Rice CM, 2005. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 309:623-626.
80. Sarasin-Filipowicz, M., J. Krol, et al. (2009). "Decreased levels of microRNA miR-122 in individuals with hepatitis C responding poorly to interferon therapy." *Nat Med* 15(1): 31-3.
81. Han JH, Houghton M. Group specific sequences and conserved secondary structures at the 3' end of HCV genome and its implication for viral replication. *Nucleic Acids Res* 1992 Jul 11;20(13):3520.
82. Kolykhalov AA, Feinstone SM, Rice CM. Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *J Virol* 1996 Jun;70(6):3363-3371.
83. Penin, F., J. Dubuisson, et al. (2004). "Structural biology of hepatitis C virus." *Hepatology* 39(1): 5-19.
84. Ait-Goughoulte, M., C. Hourieux, et al. (2006). "Core protein cleavage by signal peptide peptidase is required for hepatitis C virus-like particle assembly." *J Gen Virol* 87(Pt 4): 855-60.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

85. Boulant, S., R. Montserret, et al. (2006). "Structural determinants that target the hepatitis C virus core protein to lipid droplets." *J Biol Chem* 281(31): 22236-47.
86. Jhaveri, R., G. Qiang, et al. (2009). "Domain 3 of hepatitis C virus core protein is sufficient for intracellular lipid accumulation." *J Infect Dis* 200(11): 1781-8.
87. Shavinskaya A, Boulant S, Penin F, Mclauchlan J, Barthenschlager R, 2007. The lipid droplet binding domain of hepatitis C virus core protein is a major determinant for efficient virus assembly. *J Biol Chem* 282:37158-371169.
88. Miyanari Y, Atsuzawa K, Usuda N, Watashi K, Hishiki T, Zayas M, Bartenschlager R, Wakita T, Hijikata M, Shimotohno K, 2007. the lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol* 9:1089-1097.
89. Roohvand F, Maillard P, Lavergne JP, Boulant S, Walic M, Andreo U, Goueslin L, Helle F, Mallet A, Mclauchlan J, Budkowska A, 2009. Initiation of hepatitis C virus infection requires the dynamic microtubule network : role of the viral nucleocapsid protein. *J Biol Chem* 284 :13778-13791
90. Roussel, J., A. Pillez, et al. (2003). "Characterization of the expression of the hepatitis C virus F protein." *J Gen Virol* 84(Pt 7): 1751-9.
91. Gao, F., O. V. Nainan, et al. (2007). "Recombinant hepatitis C virus in experimentally infected chimpanzees." *J Gen Virol* 88(Pt 1): 143-7.
92. Vassilaki, N., P. Friebe, et al. (2008). "Role of the hepatitis C virus core+1 open reading frame and core cis-acting RNA elements in viral RNA translation and replication." *J Virol* 82(23): 11503-15.
93. Branch, A. D., D. D. Stump, et al. (2005). "The hepatitis C virus alternate reading frame (ARF) and its family of novel products: the alternate reading frame protein/F-protein, the double-frameshift protein, and others." *Semin Liver Dis* 25(1): 105-17.
94. Dubuisson, J., F. Penin, et al. (2002). "Interaction of hepatitis C virus proteins with host cell membranes and lipids." *Trends Cell Biol* 12(11): 517-23.
95. Op De Beeck, A., L. Cocquerel, et al. (2001). "Biogenesis of hepatitis C virus envelope glycoproteins." *J Gen Virol* 82(Pt 11): 2589-95.
96. Troesch, M., I. Meunier, et al. (2006). "Study of a novel hypervariable region in hepatitis C virus (HCV) E2 envelope glycoprotein." *Virology* 352(2): 357-67.
97. Penin, F., C. Combet, et al. (2001). "Conservation of the conformation and positive charges of hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein hypervariable region 1 points to a role in cell attachment." *J Virol* 75(12): 5703-10.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

98. Griffin, S. D., L. P. Beales, et al. (2003). "The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine." *FEBS Lett* 535(1-3): 34-8.
99. Clarke, D., S. Griffin, et al. (2006). "Evidence for the formation of a heptameric ion channel complex by the hepatitis C virus p7 protein in vitro." *J Biol Chem* 281(48): 37057-68.
100. Luik, P., C. Chew, et al. (2009). "The 3-dimensional structure of a hepatitis C virus p7 ion channel by electron microscopy." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(31): 12712-6.
101. Steinmann, E., F. Penin, S. Kallis, A. H. Patel, R. Bartenschlager, and T. Pietschmann. 2007. Hepatitis C Virus p7 Protein Is Crucial for Assembly and Release of Infectious Virions. *PLoS Pathog* 3:e103.
102. Kolykhalov AA, Mihalik K, Feinstone SM, Rice CM (2000) Hepatitis C virus-encoded enzymatic activities and conserved RNA elements in the 3' nontranslated region are essential for virus replication in vivo. *J Virol* 74(4): 2046-2051
103. Ma Y, Yates J, Liang Y, Lemon SM, Yi M. NS3 helicase domains involved in infectious intracellular hepatitis C virus particle assembly. *J Virol*. 2008 Aug;82(15):7624-39
104. Aligo, J., S. Jia, et al. (2009). Formation and function of hepatitis C virus replication complexes require residues in the carboxy-terminal domain of NS4B protein. *Virology* 393(1): 68-83.
105. Brass, V., E. Bieck, et al. (2002). An amino-terminal amphipathic alpha-helix mediates membrane association of the hepatitis C virus nonstructural protein 5A. *J Biol Chem* 277(10): 8130-9.
106. Penin, F., V. Brass, et al. (2004). Structure and function of the membrane anchor domain of hepatitis C virus nonstructural protein 5A. *J Biol Chem* 279(39): 40835-43.
107. Appel, N., M. Zayas, et al. (2008). Essential role of domain III of nonstructural protein 5A for hepatitis C virus infectious particle assembly. *PLoS Pathog* 4(3): e1000035.
108. Gale M Jr, Foy. Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus. *Nature*. 2005 Aug 18;436(7053):939-45. Review. Erratum in: *Nature*. 2005 Sep 8; 437(7056):290.
109. Bressanelli, S., L. Tomei, et al. (1999). Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(23): 13034-9.
110. Bartenschlager, R., M. Frese, et al. (2004). Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence. *Adv Virus Res* 63: 71-180.
111. Neumann, A. U., N. P. Lam, et al. (1998). "Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy." *Science* 282(5386): 103-7.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

112. Domingo, E. and J. Gomez (2007). *Quasispecies and its impact on viral hepatitis*. *Virus Res* 127(2): 131-50.
113. Robertson, B., G. Myers, et al. (1998). *Classification, nomenclature, and database development for hepatitis C virus (HCV) and related viruses: proposals for standardization*. *International Committee on Virus Taxonomy. Arch Virol* 143(12): 2493-503.
114. Tokita H, Okamoto H, Tsuda F, Song P, Nakata S, Chosa T, Iizuka H, Mishiro S, Miyakawa Y, Mayumi M. *Hepatitis C virus variants from Vietnam are classifiable into the seventh, eighth, and ninth major genetic groups*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Nov 8;91(23):11022-6.
115. Simmonds P. *Variability of hepatitis C virus*. *Hepatology* 1995 Feb; 21(2):570-583.
116. Pybus, O. G., M. A. Charleston, et al. (2001). *The epidemic behavior of the hepatitis C virus*. *Science* 292(5525): 2323-5.
117. Pawlotsky JM, Tsakiris L, Roudot-Thoraval F, Pellet C, Stuyver L, Duval J, Dhumeaux D. 1995. *Relationship between hepatitis C virus genotypes and sources of infection in patients with chronic hepatitis C*. *J Infect Dis* 171:1607-1610.
118. Martell, M., J. I. Esteban, et al. (1992). *"Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution*. *J Virol* 66(5): 3225-9.
119. Weiner AJ, Geysen HM, Christopherson C, Hall JE, Mason TJ, Saracco G, Bonino F, Crawford K, Marion CD, Crawford KA, et al. *Evidence for immune selection of hepatitis C virus (HCV) putative envelope glycoprotein variants: potential role in chronic HCV infections*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992 Apr 15;89(8):3468-3472.
120. Nagasaka A, Hige S, Tsunematsu I, Yoshida J, Sasaki Y, Matsushima T, Asaka M. *Changes in hepatitis C virus quasispecies and density populations in patients before and after interferon therapy*. *J Med Virol*. 1996 Nov;50(3):214-20.
122. Toniutto P, Fabris C, Pirisi M. *Antiviral treatment of hepatitis C*. *Expert Opin Pharmacother*. 2006 Oct;7(15):2025-35. Review.
121. Adinolfi, L. E., M. Gambardella, et al. (2001). *Steatosis accelerates the progression of liver damage of chronic hepatitis C patients and correlates with specific HCV genotype and visceral obesity*. *Hepatology* 33(6): 1358-64.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

123. Okuda M, Li K, Beard MR, Showalter LA, Scholle F, Lemon SM, Weinman SA. Mitochondrial injury, oxidative stress, and antioxidant gene expression are induced by hepatitis C virus core protein. *Gastroenterology*. 2002 Feb;122(2):366-75.
124. Law M, Maruyama T, Lewis J, Giang E, Tarr AW, Stamataki Z, Gastaminza P, Chisari FV, Jones IM, Fox RI, Ball JK, McKeating JA, Kneteman NM, Burton DR (2008) Broadly neutralizing antibodies protect against hepatitis C virus quasispecies challenge. *Nat Med* 14(1): 25-27.
125. Ito T, Mukaigawa J, Zuo J, Hirabayashi Y, Mitamura K, Yasui K (1996) Cultivation of hepatitis C virus in primary hepatocyte culture from patients with chronic hepatitis C results in release of high titre infectious virus. *J Gen Virol* 77 ( Pt 5): 1043-1054.
126. Fournier C, Sureau C, Coste J, Ducos J, Pageaux G, Larrey D, Domergue J, Maurel P (1998). In vitro infection of adult normal human hepatocytes in primary culture by hepatitis C virus. *J Gen Virol* 79 ( Pt 10): 2367-2374
127. Lanford RE, Notvall L, Chavez D, White R, Frenzel G, Simonsen C, Kim J (1993) Analysis of hepatitis C virus capsid, E1, and E2/NS1 proteins expressed in insect cells. *Virology* 197(1): 225-235
128. Rumin S, Berthillon P, Tanaka E, Kiyosawa K, Trabaud MA, Bizollon T, Gouillat C, Gripon P, Guguen-Guillouzo C, Inchauspe G, Trepo C (1999) Dynamic analysis of hepatitis C virus replication and quasispecies selection in long-term cultures of adult human hepatocytes infected in vitro. *J Gen Virol* 80 ( Pt 11): 3007-3018
129. Muller HM, Pfaff E, Goeser T, Kallinowski B, Solbach C, Theilmann L (1993) Peripheral blood leukocytes serve as a possible extrahepatic site for hepatitis C virus replication. *J Gen Virol* 74 ( Pt 4): 669-676.
130. Cribier B, Schmitt C, Bingen A, Kirn A, Keller F (1995) In vitro infection of peripheral blood mononuclear cells by hepatitis C virus. *J Gen Virol* 76 ( Pt 10): 2485-2491
131. Hijikata M, Mizuno K, Rikihisa T, Shimizu YK, Iwamoto A, Nakajima N, Yoshikura H (1995) Selective transmission of hepatitis C virus in vivo and in vitro. *Arch Virol* 140(9): 1623-1628.
132. Kato N, Ikeda M, Mizutani T, Sugiyama K, Noguchi M, Hirohashi S, Shimotohno K (1996) Replication of hepatitis C virus in cultured non-neoplastic human hepatocytes. *Jpn J Cancer Res* 87(8): 787-792.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

133. Kato N, Nakazawa T, Mizutani T, Shimotohno K (1995) Susceptibility of human Tlymphotropic virus type I infected cell line MT-2 to hepatitis C virus infection. *Biochem Biophys Res Commun* 206(3): 863-869.
134. Lohmann V, Korner F, Koch J, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R (1999) Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 285(5424): 110-113.
135. Sumpter R, Jr., Loo YM, Foy E, Li K, Yoneyama M, Fujita T, Lemon SM, Gale M, Jr. (2005) Regulating intracellular antiviral defense and permissiveness to hepatitis C virus RNA replication through a cellular RNA helicase, RIG-I. *J Virol* 79(5): 2689-2699.
136. Blight KJ, Kolykhalov AA, Rice CM (2000). Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science* 290(5498): 1972-1974.
137. Lohmann V, Korner F, Dobierzewska A, Bartenschlager R (2001) Mutations in hepatitis C virus RNAs conferring cell culture adaptation. *J Virol* 75(3): 1437-1449
138. Pietschmann T, Lohmann V, Kaul A, Krieger N, Rinck G, Rutter G, Strand D, Bartenschlager R (2002) Persistent and transient replication of full-length hepatitis C virus genomes in cell culture. *J Virol* 76(8): 4008-4021.
139. Bartosch B, Dubuisson J, Cosset FL (2003) Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J Exp Med* 197(5): 633-642.
140. Hsu M, Zhang J, Flint M, Logvinoff C, Cheng-Mayer C, Rice CM, McKeating JA (2003) Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(12): 7271-7276.
141. Bartosch B, Bukh J, Meunier JC, Granier C, Engle RE, Blackwelder WC, Emerson SU, Cosset FL, Purcell RH (2003) In vitro assay for neutralizing antibody to hepatitis C virus: evidence for broadly conserved neutralization epitopes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(24): 14199-14204.
142. Zhong J, Gastaminza P, Cheng G, Kapadia S, Kato T, Burton DR, Wieland SF, Uprichard SL, Wakita T, Chisari FV (2005) Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(26): 9294-9299.
143. Kato T, Matsumura T, Heller T, Saito S, Sapp RK, Murthy K, Wakita T, Liang TJ (2007) Production of infectious hepatitis C virus of various genotypes in cell cultures. *J Virol* 81(9): 4405-4411.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

144. Pietschmann T, Kaul A, Koutsoudakis G, Shavinskaya A, Kallis S, Steinmann E, Abid K, Negro F, Dreux M, Cosset FL, Bartenschlager R (2006) Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(19): 7408-7413.
145. Koutsoudakis G, Kaul A, Steinmann E, Kallis S, Lohmann V, Pietschmann T, Bartenschlager R (2006) Characterization of the early steps of hepatitis C virus infection by using luciferase reporter viruses. *J Virol* 80(11): 5308-5320.
146. Schaller T, Appel N, Koutsoudakis G, Kallis S, Lohmann V, Pietschmann T, Bartenschlager R (2007) Analysis of hepatitis C virus superinfection exclusion by using novel fluorochrome gene-tagged viral genomes. *J Virol* 81(9): 4591-4603.
147. Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, Murthy K, Habermann A, Krausslich HG, Mizokami M, Bartenschlager R, Liang TJ (2005) Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 11(7): 791-796.
148. Zeisel MB, Koutsoudakis G, Schnober EK, Haberstroh A, Blum HE, Cosset FL, Wakita T, Jaeck D, Doffoel M, Royer C, Soulier E, Schvoerer E, Schuster C, Stoll-Keller F, Bartenschlager R, Pietschmann T, Barth H, Baumert TF (2007) Scavenger receptor class B type I is a key host factor for hepatitis C virus infection required for an entry step closely linked to CD81. *Hepatology* 46(6): 1722-1731
149. Bartosch B, Cosset FL (2006) Cell entry of hepatitis C virus. *Virology* 348:1-12.
150. Agnello V, Abel G, Elfahal M, Knight GB, Zhang QX (1999) Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* :12766-71.
151. Scarselli E, Ansuini H, Cerino R, Roccasecca RM, Acali S, et al. (2002). The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *Embo J* 21:5017- 25.
152. Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, et al. (1998) Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 282:938-41.
153. Evans MJ, von Hahn T, Tscherne DM, Syder AJ, Panis M, et al. (2007) Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* 446:801-5.
154. Liu, S., W. Yang, et al. (2009). "Tight junction proteins claudin-1 and occludin control hepatitis C virus entry and are downregulated during infection to prevent superinfection." *J Virol* 83(4): 2011-4.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

155. Dubuisson J, Helle F, Cocquerel L (2008) Early steps of the hepatitis C virus life cycle. *Cell Microbiol* 10:821-7.
156. Caussin-Schwemling C, Schmitt C, Stoll-Keller F (2001) Study of the infection of human blood derived monocyte/macrophages with hepatitis C virus in vitro. *J Med Virol* 65:14-22.
157. Zignego AL, Macchia D, Monti M, Thiers V, Mazzetti M, et al. (1992) Infection of peripheral mononuclear blood cells by hepatitis C virus. *J Hepatol* 15:382-6.
158. Meertens L, Bertaux C, Dragic T (2006) Hepatitis C virus entry requires a critical postinternalization step and delivery to early endosomes via clathrin-coated vesicles. *J Virol* 80(23): 11571-11578.
159. Bartosch B, Dubuisson J, Cosset FL (2003) Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J Exp Med* 197(5): 633-642.
160. Tscherne DM, Jones CT, Evans MJ, Lindenbach BD, McKeating JA, Rice CM (2006) Time and temperature-dependent activation of hepatitis C virus for low-pH-triggered entry. *J Virol* 80(4): 1734-1741
161. Spahn CM, Kieft JS, Grassucci RA, Penczek PA, Zhou K, Doudna JA, Frank J. Hepatitis C virus IRES RNA-induced changes in the conformation of the 40s ribosomal subunit. *Science*. 2001 Mar 9;291(5510):1959-62
162. Suzuki T, Ishii K, Aizaki H, Wakita T. Hepatitis C viral life cycle. *Adv Drug Deliv Rev*. 2007 Oct 10;59(12):1200-12. Epub 2007 Aug 9. Review.
163. Ali N, Siddiqui A. The La antigen binds 5' noncoding region of the hepatitis C virus RNA in the context of the initiator AUG codon and stimulates internal ribosome entry site-mediated translation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Mar 18;94(6):2249-54.
164. Anwar A, Ali N, Tanveer R, Siddiqui A. Demonstration of functional requirement of polypyrimidine tract-binding protein by SELEX RNA during hepatitis C virus internal ribosome entry site-mediated translation initiation. *J Biol Chem*. 2000 Nov 3;275(44):34231-5.
165. Fukushi S, Okada M, Kageyama T, Hoshino FB, Nagai K, Katayama K. Interaction of poly(rC)-binding protein 2 with the 5'-terminal stem loop of the hepatitis C-virus genome. *Virus Res*. 2001 Jan;73(1):67-79.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

166. Shimoike T, Koyama C, Murakami K, Suzuki R, Matsuura Y, Miyamura T, Suzuki T. Down-regulation of the internal ribosome entry site (IRES)-mediated translation of the hepatitis C virus: critical role of binding of the stem-loop III<sub>d</sub> domain of IRES and the viral core protein. *Virology*. 2006 Feb 20;345(2):434-45. Epub 2005 Nov 17.
167. Wang TH, Rijnbrand RC, Lemon SM. Core protein-coding sequence, but not core protein, modulates the efficiency of cap-independent translation directed by the internal ribosome entry site of hepatitis C virus. *J Virol*. 2000 Dec;74(23):11347-58.
168. Kato, T., et al. Cell culture and infection system for hepatitis C virus. *Nat Protoc* 1, 2334-2339 (2006).
169. Grakoui A, McCourt DW, Wychowski C, Feinstone SM, Rice CM. Characterization of the hepatitis C virus-encoded serine proteinase: determination of proteinase-dependent polyprotein cleavage sites. *J Virol*. 1993 May;67(5):2832-43.
170. McLauchlan J, Lemberg MK, Hope G, Martoglio B. Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *EMBO J*. 2002 Aug 1;21(15):3980-8.
171. Bartenschlager R, Ahlborn-Laake L, Mous J, Jacobsen H. Kinetic and structural analyses of hepatitis C virus polyprotein processing. *J Virol*. 1994 Aug;68(8):5045-55.
172. Quinkert D, Bartenschlager R, Lohmann V (2005) Quantitative analysis of the hepatitis C virus replication complex. *J Virol* 79(21): 13594-13605.
173. Miyanari Y, Hijikata M, Yamaji M, Hosaka M, Takahashi H, Shimotohno K (2003) Hepatitis C virus non-structural proteins in the probable membranous compartment function in viral genome replication. *J Biol Chem* 278(50): 50301-50308.
174. Lai, C.-K., Jeng, K.-S., Machida, K. & Lai, M. M. C. (2008). Association of hepatitis C virus replication complexes with microtubules and actin filaments is dependent on the interaction of NS3 and NS5A. *J Virol* 82, 8838-8848.
175. Gosert, R., Egger, D., Lohmann, V., Bartenschlager, R., Blum, H. E., Bienz, K. & Moradpour, D. (2003). Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons. *Journal of virology* 77, 5487-176. Jopling CL,



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

176. Moradpour, D., Gosert, R., Egger, D., Penin, F., Blum, H. E. & Bienz, K. (2003). *Membrane association of hepatitis C virus nonstructural proteins and identification of the membrane alteration that harbors the viral replication complex. Antiviral research 60, 103–109.*
177. Egger, D., Wolk, B., Gosert, R., Bianchi, L., Blum, H. E., Moradpour, D. & Bienz, K. (2002). *Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. Journal of virology 76, 5974.*
178. Gao L, Aizaki H, He JW, Lai MM (2004) *Interactions between viral nonstructural proteins and host protein hVAP-33 mediate the formation of hepatitis C virus RNA replication complex on lipid raft. J Virol 78(7): 3480-3488.*
179. Hamamoto I, Nishimura Y, Okamoto T, Aizaki H, Liu M, Mori Y, Abe T, Suzuki T, Lai MM, Miyamura T, Moriishi K, Matsuura Y (2005) *Human VAP-B is involved in hepatitis C virus replication through interaction with NS5A and NS5B. J Virol 79(21): 13473-13482.*
180. Kaul A, Stauffer S, Berger C, Pertel T, Schmitt J, Kallis S, Zayas M, Lohmann V, Luban J, Bartenschlager R (2009) *Essential role of cyclophilin A for hepatitis C virus replication and virus production and possible link to polyprotein cleavage kinetics. PLoS Pathog 5(8): e1000546*
181. You, S. & Rice, C. M. (2008). *3' RNA elements in hepatitis C virus replication: kissing partners and long poly(U). J Virol 82, 184-195.*
182. Tai, C. L., Chi, W. K., Chen, D. S. & Hwang, L. H. (1996). *The helicase activity associated with hepatitis C virus nonstructural protein 3 (NS3). J Virol 70, 8477-8484.*
183. Pang, P. S., Jankowsky, E., Planet, P. J. & Pyle, A. M. (2002). *The hepatitis C viral NS3 protein is a processive DNA helicase with cofactor enhanced RNA unwinding. EMBO J 21, 1168-1176.*
184. Kapadia, S. B. & Chisari, F. V. (2005). *Hepatitis C virus RNA replication is regulated by host geranylgeranylation and fatty acids. Proc Natl Acad Sci U S A 102, 2561-2566.*
185. Roingeard, P., and Hourieux, C. (2008). *Hepatitis C virus core protein, lipid droplets and steatosis. Journal of viral hepatitis 15, 157-164.*
186. Murray PJ (2007) *The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. J Immunol 178:2623-9.*

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

187. Jones, C. T., C. L. Murray, D. K. Eastman, J. Tassello, and C. M. Rice. 2007. Hepatitis C virus p7 and NS2 proteins are essential for production of infectious virus. *J Virol* 81:8374-83.
188. Steinmann, E., F. Penin, S. Kallis, A. H. Patel, R. Bartenschlager, and T. Pietschmann. 2007. Hepatitis C Virus p7 Protein Is Crucial for Assembly and Release of Infectious Virions. *PLoS Pathog* 3:e103.
189. Huang Y, Staschke, K, De FR, Tan SL, 2007. Phosphorylation of hepatitis C virus NS5A nonstructural protein: a new paradigm for phosphorylation-dependent viral RNA replication? *Virology* 364: 1-9.
190. Gastaminza P, Cheng G, Wieland S, Zhong J, Liao W, Chisari FV (2008) Cellular determinants of hepatitis C virus assembly, maturation, degradation, and secretion. *J Virol* 82(5): 2120-2129.
191. Yi M, Ma Y, Yates J, Lemon SM (2009) Trans-complementation of an NS2 defect in a late step in hepatitis C virus (HCV) particle assembly and maturation. *PLoS Pathog* 5(5): e1000403.
192. Huang H, Sun F, Owen DM, Li W, Chen Y, Gale M, Jr., Ye J (2007) Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(14): 5848-5853.
193. Cai L, de Beer MC, de Beer FC, van der Westhuyzen DR (2005) Serum amyloid A is a ligand for scavenger receptor class B type I and inhibits high density lipoprotein binding and selective lipid uptake. *J Biol Chem* 280(4): 2954-2961.
194. Popescu CI, Dubuisson J Role of lipid metabolism in hepatitis C virus assembly and entry. *Biol Cell* 102(1): 63-74.
195. Beckman M. Great balls of fat. *Science* 2006 ; 311 : 1232-4.
196. Martin s, Parton RG. Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006 ; 7 : 373-8.
197. Olofsson SO, Boström P, Andersson L, Rutberg M, Levin M, Perman J, Borén J. Triglyceride containing lipid droplets and lipid droplet-associated proteins. *Curr Opin Lipidol*. 2008 Oct;19(5):441-7.
198. Moradpour D, Penin F, Rice CM (2007) Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Microbiol* 5(6): 453-463.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

199. Barba G, Harper F, Harada T, Kohara M, Goulinet S, Matsuura Y, Eder G, Schaff Z, Chapman MJ, Miyamura T, Brechot C. Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997 Feb 18;94(4):1200-1205.
200. Boulant S, Targett-Adams P, McLauchlan J. Disrupting the association of hepatitis C virus core protein with lipid droplets correlates with a loss in production of infectious virus. *J Gen Virol*. 2007 Aug;88(Pt 8):2204-13.
201. Shavinskaya A, Boulant S, Penin F, McLauchlan J, Barthenschlager R, 2007. The lipid droplet binding domain of hepatitis C virus core protein is a major determinant for efficient virus assembly. *J Biol Chem* 282:37158-371169.
202. Targett-Adams P, Hope G, Boulant S, McLauchlan J. Maturation of hepatitis C virus core protein by signal peptide peptidase is required for virus production. *J Biol Chem*. 2008 Jun 13;283(24):16850-9. Epub 2008 Apr 18.
203. Boulant S, Douglas MW, Moody L, Budkowska A, Targett-Adams P, McLauchlan J. Hepatitis C virus core protein induces lipid droplet redistribution in a microtubule- and dynein-dependent manner. *Traffic*. 2008 Aug;9(8):1268-82.
204. Farci P, Alter HJ, Wong D, Miller RH, Shih JW, Jett B, Purcell RH (1991) A long-term study of hepatitis C virus replication in non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med* 325(2): 98-104
205. Farci P, Alter HJ, Shimoda A, Govindarajan S, Cheung LC, Melpolder JC, Sacher RA, Shih JW, Purcell RH (1996) Hepatitis C virus-associated fulminant hepatic failure. *N Engl J Med*335(9): 631-634.
206. Barrera JM, Bruguera M, Ercilla MG, Gil C, Celis R, Gil MP, del Valle Onorato M, Rodes J, Ordinas A (1995) Persistent hepatitis C viremia after acute self-limiting posttransfusion hepatitis C. *Hepatology* 21(3): 639-644
207. Vaquer P, Canet R, Llompart A, Riera J, Obrador A, Gaya J (1994) Histological evolution of chronic hepatitis C. Factors related to progression. *Liver* 14(5): 265-269
208. Negro F (2009) Peroxisome proliferator-activated receptors and hepatitis C virus-induced insulin resistance. *PPAR Res* 2009:483485.
209. Lerat H, Honda M, Beard MR, Loesch K, Sun J, Yang Y, Okuda M, Gosert R, Xiao SY, Weinman SA, Lemon SM. Steatosis and liver cancer in transgenic mice expressing the structural and nonstructural proteins of hepatitis C virus. *Gastroenterology* 2002 Feb;122(2):352-365.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

210. Moriya K, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Tsutsumi T, Ishibashi K, Matsuura Y, Kimura S, Miyamura T, Koike K. The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nat Med* 1998 Sep;4(9):1065-1067.
211. Ray RB, Steele R, Meyer K, Ray R. Transcriptional repression of p53 promoter by hepatitis C virus core protein. *J Biol Chem* 1997 Apr 25;272(17):10983-10986.
212. Lu W, Lo SY, Chen M, Wu K, Fung YK, Ou JH. Activation of p53 tumor suppressor by hepatitis C virus core protein. *Virology* 1999 Nov 10;264(1):134-141.
213. Alisi A, Giambartolomei S, Cupelli F, Merlo P, Fontemaggi G, Spaziani A, Balsano C. Physical and functional interaction between HCV core protein and the different p73 isoforms. *Oncogene* 2003 May 1;22(17):2573-2580.
214. Cho J, Baek W, Yang S, Chang J, Sung YC, Suh M. HCV core protein modulates Rb pathway through pRb down-regulation and E2F-1 up-regulation. *Biochim Biophys Acta* 2001 Feb 5;1538(1):59-66.
215. Wang F, Yoshida I, Takamatsu M, Ishido S, Fujita T, Oka K, Hotta H. Complex formation between hepatitis C virus core protein and p21Waf1/Cip1/Sdi1. *Biochem Biophys Res Commun* 2000 Jul 5;273(2):479-484.
216. Pawlotsky, J. M., S. Chevaliez, and J. G. McHutchison. 2007. The hepatitis C virus life cycle as a target for new antiviral therapies. *Gastroenterology* 132:1979-98.
217. Yamanaka T, Uchida M, Doi T. Innate form of HCV core protein plays an important role in the localization and the function of HCV core protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2002 Jun 14;294(3):521-527.
218. Kozyraki R, Scoazec JY, Flejou JF, D'Errico A, Bedossa P, Terris B, Fiorentino M, Bringuier AF, Grigioni WF, Feldmann G. Expression of cadherins and alpha-catenin in primary epithelial tumors of the liver. *Gastroenterology* 1996 Apr;110(4):1137-1149.
219. Varaklioti A, Vassilaki N, Georgopoulou U, Mavromara P. Alternate translation occurs within the core coding region of the hepatitis C viral genome. *J Biol Chem* 2002 May 17;277(20):17713-17721.
220. Hayashi J, Aoki H, Kajino K, Moriyama M, Arakawa Y, Hino O. Hepatitis C virus core protein activates the MAPK/ERK cascade synergistically with tumor promoter TPA, but not with epidermal growth factor or transforming growth factor alpha. *Hepatology* 2000 Nov;32(5):958-961.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

221. Giambartolomei S, Covone F, Levrero M, Balsano C. Sustained activation of the Raf/MEK/Erk pathway in response to EGF in stable cell lines expressing the Hepatitis C Virus (HCV) core protein. *Oncogene* 2001 May 3;20(20):2606-2610.
222. Ray RB, Steele R, Basu A, Meyer K, Majumder M, Ghosh AK, Ray R. Distinct functional role of Hepatitis C virus core protein on NF-kappaB regulation is linked to genomic variation. *Virus Res* 2002 Jul;87(1):21-29.
223. Fukutomi T, Zhou Y, Kawai S, Eguchi H, Wands JR, Li J. Hepatitis C virus core protein stimulates hepatocyte growth: correlation with upregulation of wnt-1 expression. *Hepatology* 2005 May;41(5):1096-1105.
224. Basu A, Meyer K, Lai KK, Saito K, Di Bisceglie AM, Grosso LE, Ray RB, Ray R. Microarray analyses and molecular profiling of Stat3 signaling pathway induced by hepatitis C virus core protein in human hepatocytes. *Virology* 2006 Jun 5;349(2):347- 358.
225. Kittlesen DJ, Chianese-Bullock KA, Yao ZQ, Braciale TJ, Hahn YS. Interaction between complement receptor gC1qR and hepatitis C virus core protein inhibits Tlymphocyte proliferation. *J Clin Invest* 2000 Nov;106(10):1239-1249.
226. Lerat H, Honda M, Beard MR, Loesch K, Sun J, Yang Y, Okuda M, Gosert R, Xiao SY, Weinman SA, Lemon SM. Steatosis and liver cancer in transgenic mice expressing the structural and nonstructural proteins of hepatitis C virus. *Gastroenterology* 2002 Feb;122(2):352-365.
227. Moriya K, Yotsuyanagi H, Shintani Y, Fujie H, Ishibashi K, Matsuura Y, Miyamura T, Koike K. Hepatitis C virus core protein induces hepatic steatosis in transgenic mice. *J Gen Virol* 1997 Jul;78 (Pt 7):1527-1531.
228. Hope RG, Murphy DJ, McLauchlan J. The domains required to direct core proteins of hepatitis C virus and GB virus-B to lipid droplets share common features with plant oleosin proteins. *J Biol Chem* 2002 Feb 8;277(6):4261-4270.
229. Sabile A, Perlemuter G, Bono F, Kohara K, Demaugre F, Kohara M, Matsuura Y, Miyamura T, Brechot C, Barba G. Hepatitis C virus core protein binds to apolipoprotein AII and its secretion is modulated by fibrates. *Hepatology* 1999 Oct;30(4):1064-1076.
230. Perlemuter G, Sabile A, Letteron P, Vona G, Topilco A, Chretien Y, Koike K, Pessayre D, Chapman J, Barba G, Brechot C. Hepatitis C virus core protein inhibits microsomal triglyceride transfer protein activity and very low density lipoprotein secretion: a model of viral-related steatosis. *Faseb J* 2002 Feb;16(2):185-194.
231. Moriya K, Nakagawa K, Santa T, Shintani Y, Fujie H, Miyoshi H, Tsutsumi T, Miyazawa T, Ishibashi K, Horie T, Imai K, Todoroki T, Kimura S, Koike K. Oxidative stress in the



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

*absence of inflammation in a mouse model for hepatitis C virus-associated hepatocarcinogenesis. Cancer Res* 2001 Jun 1;61(11):4365-4370.

232. Factor VM, Laskowska D, Jensen MR, Woitach JT, Popescu NC, Thorgeirsson SS. Vitamin E reduces chromosomal damage and inhibits hepatic tumor formation in a transgenic mouse model. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000 Feb 29;97(5):2196-2201.

233. Moucari R, Asselah T, Cazals-Hatem D, Voitot H, Boyer N, Ripault MP, Sobesky R, Martinot-Peignoux M, Maylin S, Nicolas-Chanoine MH, Paradis V, Vidaud M, Valla D, Bedossa P, Marcellin P. Insulin resistance in chronic hepatitis C: association with genotypes 1 and 4, serum HCV RNA level, and liver fibrosis. *Gastroenterology*. 2008 Feb;134(2):416-23. Epub 2007 Nov 12.

234. Dore GJ, Cooper DA. The impact of HIV therapy on co-infection with hepatitis B and hepatitis C viruses. *Curr Opin Infect Dis*. 2001 Dec;14(6):749-55. Review.

235. Wiley TE, McCarthy M, Breidi L, McCarthy M, Layden TJ. Impact of alcohol on the histological and clinical progression of hepatitis C infection. *Hepatology*. 1998 Sep;28(3):805-9.

236. Sullivan DG, Bruden D, Deubner H, McArdle S, Chung M, Christensen C, Hennessy T, Homan C, Williams J, McMahon BJ, Gretch DR. Hepatitis C virus dynamics during natural infection are associated with long-term histological outcome of chronic hepatitis C disease. *J Infect Dis*. 2007 Jul 15;196(2):239-48. Epub 2007 Jun 7.

237. Maylin S, Martinot-Peignoux M, Moucari R, Boyer N, Ripault MP, Cazals-Hatem D, Giuily N, Castelnau C, Cardoso AC, Asselah T, Féray C, Nicolas-Chanoine MH, Bedossa P, Marcellin P. Eradication of hepatitis C virus in patients successfully treated for chronic hepatitis C. *Gastroenterology*. 2008 Sep;135(3):821-9. Epub 2008 May 21.

238. McHutchison JG, Patel K, Schiff ER, Gitlin N, Mur RE, Everson GT, Carithers RL Jr, Davis GL, Marcellin P, Shiffman ML, Harvey J, Albrecht JK; International Hepatitis Interventional Therapy Group. Clinical trial: interferon alpha-2b continuous long-term therapy vs. repeated 24-week cycles for re-treating chronic hepatitis C. *Aliment Pharmacol Ther*. 2008 Mar 1;27(5):422-32. Epub 2007 Dec 11.

239. Sherman KE, Rouster SD, Chung RT, Rajcic N. Hepatitis C Virus prevalence among patients infected with Human Immunodeficiency Virus: a cross-sectional analysis of the US adult AIDS Clinical Trials Group. *Clin Infect Dis*. 2002 Mar 15;34(6):831-7. Epub 2002 Feb 6.

240. Pineda JA, García-García JA, Aguilar-Guisado M, Ríos-Villegas MJ, Ruiz-Morales J, Rivero A, del Valle J, Luque R, Rodríguez-Baño J, González-Serrano M, Camacho A, Macías J, Grilo I, Gómez-Mateos JM. Clinical progression of hepatitis C virus-related chronic liver

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

disease in human immunodeficiency virus-infected patients undergoing highly active antiretroviral therapy. *Hepatology*. 2007 Sep;46(3):622-30.

241. Sugano M, Hayashi Y, Yoon S, Kinoshita M, Ninomiya T, Ohta K, Itoh H, Kasuga M. Quantitation of hepatitis C viral RNA in liver and serum samples using competitive polymerase chain reaction. *J Clin Pathol*. 1995 Sep; 48(9):820-5

242. Pal S, Shuhart MC, Thomassen L, Emerson SS, Su T, Feuerborn N, Kae J, Gretch DR. Intrahepatic hepatitis C virus replication correlates with chronic hepatitis C disease severity in vivo. *J Virol*. 2006 Mar;80(5):2280-90.

243. Blackard JT, Smeaton L, Hiasa Y, Horiike N, Onji M, Jamieson DJ, Rodriguez I, Mayer KH, Chung RT. Detection of hepatitis C virus (HCV) in serum and peripheral-blood mononuclear cells from HCV-monoinfected and HIV/HCV-coinfected persons. *J Infect Dis*. 2005 Jul 15;192(2):258-65. Epub 2005 Jun 7.

244. Forton DM, Thomas HC, Taylor-Robinson SD. Central nervous system involvement in hepatitis C virus infection. *Metab Brain Dis*. 2004 Dec;19(3-4):383-91. Review.

245. Laskus T, Radkowski M, Wang LF, Vargas H, Rakela J. The presence of active hepatitis C virus replication in lymphoid tissue in patients coinfecting with human immunodeficiency virus type 1. *J Infect Dis*. 1998 Oct;178(4):1189-92.

446. Roque Afonso, A.M., et al., Nonrandom distribution of hepatitis C virus quasispecies in plasma and peripheral blood mononuclear cell subsets. *J Virol*, 1999. 73(11): p. 9213-21.

447. Lerat, H., et al., Specific detection of hepatitis C virus minus strand RNA in hematopoietic cells. *J Clin Invest*, 1996. 97(3): p. 845-51.

448. Ducoulombier, D., et al., Frequent compartmentalization of hepatitis C virus variants in circulating B cells and monocytes. *Hepatology*, 2004. 39(3): p. 817-25

449. Zehender, G., et al., Compartmentalization of hepatitis C virus quasispecies in blood mononuclear cells of patients with mixed cryoglobulinemic syndrome. *J Virol*, 2005. 79(14): p.9145-56.

250. Vassilaki, N., P. Friebe, et al. (2008). "Role of the hepatitis C virus core+1 open reading frame and core cis-acting RNA elements in viral RNA translation and replication." *J Virol* 82(23): 11503-15.

251. Andre, P., F. Komurian-Pradel, et al. (2002). «Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles.» *J Virol* 76(14): 6919-28.

252. Deforges, S., A. Evlashev, et al. (2004). «Expression of hepatitis C virus proteins in epithelial intestinal cells in vivo.» *J Gen Virol* 85(Pt 9): 2515-23.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

253. Reynolds JE, Kaminski A, Kettinen HJ, Grace K, Clarke BE, Carroll AR, Rowlands DJ, Jackson RJ. Unique features of internal initiation of hepatitis C virus RNA translation. *Embo J* 1995 Dec 1;14(23):6010-6020.
254. Honda M, Ping LH, Rijnbrand RC, Amphlett E, Clarke B, Rowlands D, Lemon SM. Structural requirements for initiation of translation by internal ribosome entry within genome-length hepatitis C virus RNA. *Virology* 1996 Aug 1;222(1):31-42.
255. Simmonds P, 2004. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus—15 year on. *J Gen Virol* 85 :3173-3188
256. Randall G, Panis M, Cooper JD, Tellinghuisen TL, Sukhodolets KE, Pfeffer S, Landthaler M, Landgraf P, Kan S, Lindenbach BD, Chien M, Weir DB, Russo JJ, Ju J, Brownstein MJ, Sheridan R, Sander C, Zavolan M, Tuschl T, Rice CM (2007) Cellular cofactors affecting hepatitis C virus infection and replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(31): 12884-12889.
257. Wolk B, Buchele B, Moradpour D, Rice CM (2008) A dynamic view of hepatitis C virus replication complexes. *J Virol* 82(21): 10519-10531.
258. Peterson, E. A. and E. M. Petty (2010). Conquering the complex world of human septins: implications for health and disease. *Clin Genet* 77(6): 511-24.
259. Spiliotis, E. T. and W. J. Nelson (2006). Here come the septins: novel polymers that coordinate intracellular functions and organization. *J Cell Sci* 119(Pt 1): 4-10.
260. Cao, L., W. Yu, Y. Wu and L. Yu (2009). The evolution, complex structures and function of septin proteins. *Cell Mol Life Sci* 66(20): 3309-23.
261. Connolly, D., I. Abdesselam, P. Verdier-Pinard and C. Montagna (2011). Septin roles in tumorigenesis. *Biol Chem* 392(8-9): 725-38.
262. Liu, M., S. Shen, F. Chen, W. Yu and L. Yu (2010a). Linking the septin expression with carcinogenesis. *Mol Biol Rep*.
263. Cossart, P., J. Pizarro-Cerda and M. Lecuit (2003). Invasion of mammalian cells by *Listeria monocytogenes*: functional mimicry to subvert cellular functions. *Trends Cell Biol* 13(1): 23-31.
264. Gruenheid, S. and B. B. Finlay (2003). Microbial pathogenesis and cytoskeletal function. *Nature* 422(6933): 775-81.
265. Smith, A. E. and A. Helenius (2004). How viruses enter animal cells. *Science* 304(5668): 237-42.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

266. Pizarro-Cerda, J., R. Jonquieres, E. Gouin, J. Vandekerckhove, J. Garin and P. Cossart (2002). Distinct protein patterns associated with *Listeria monocytogenes* InlA- or InlB-phagosomes. *Cell Microbiol* 4(2): 101-15.
267. Hall, P. A. and S. E. Russell (2004). The pathobiology of the septin gene family. *J Pathol* 204(4): 489-505.
268. Osaka, M., J. D. Rowley and N. J. Zeleznik-Le (1999). MSF (MLL septin-like fusion), a fusion partner gene of MLL, in a therapy-related acute myeloid leukemia with a t(11;17)(q23;q25). *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(11): 6428-33.
269. Kalikin, L. M., H. L. Sims and E. M. Petty (2000). Genomic and expression analyses of alternatively spliced transcripts of the MLL septin-like fusion gene (MSF) that map to a 17q25 region of loss in breast and ovarian tumors. *Genomics* 63(2): 165-72.
270. Russell, S. E., M. A. McIlhatton, J. F. Burrows, P. G. Donaghy, S. Chanduloy, E. M. Petty, L. M. Kalikin, S. W. Church, S. McIlroy, D. P. Harkin, G. W. Keilty, A. N. Cranston, J. Weissenbach, I. Hickey and P. G. Johnston (2000). Isolation and mapping of a human septin gene to a region on chromosome 17q, commonly deleted in sporadic epithelial ovarian tumors. *Cancer Res* 60(17): 4729-34.
271. McIlhatton, M. A., J. F. Burrows, P. G. Donaghy, S. Chanduloy, P. G. Johnston and S. E. Russell (2001). Genomic organization, complex splicing pattern and expression of a human septin gene on chromosome 17q25.3. *Oncogene* 20(41): 5930-9.
272. Connolly, D., Z. Yang, M. Castaldi, N. Simmons, M. H. Oktay, S. Coniglio, M. J. Fazzari, P. Verdier-Pinard and C. Montagna (2011). Septin 9 isoform expression, localization and epigenetic changes during human and mouse breast cancer progression. *Breast Cancer Res* 13(4): R76.
273. deVos, T., R. Tetzner, F. Model, G. Weiss, M. Schuster, J. Distler, K. V. Steiger, R. Grutzmann, C. Pilarsky, J. K. Habermann, P. R. Fleshner, B. M. Oubre, R. Day, A. Z. Sledziewski and C. Lofton-Day (2009). Circulating methylated SEPT9 DNA in plasma is a biomarker for colorectal cancer. *Clin Chem* 55(7): 1337-46.
274. Macara, I. G., R. Baldarelli, C. M. Field, M. Glotzer, Y. Hayashi, S. C. Hsu, M. B. Kennedy, M. Kinoshita, M. Longtine, C. Low, L. J. Maltais, L. McKenzie, T. J. Mitchison, T. Nishikawa, M. Noda, E. M. Petty, M. Peifer, J. R. Pringle, P. J. Robinson, D. Roth, S. E. Russell, H. Stuhlmann, M. Tanaka, T. Tanaka, W. S. Trimble, J. Ware, N. J. Zeleznik-Le and B. Zieger (2002). Mammalian septins nomenclature. *Mol Biol Cell* 13(12): 4111-3.
275. Amir, S. and N. J. Mabeesh (2007). SEPT9\_V1 protein expression is associated with human cancer cell resistance to microtubule-disrupting agents. *Cancer Biol Ther* 6(12): 1926-31.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

276. Johnson, E. S. and G. Blobel (1999). Cell cycle-regulated attachment of the ubiquitin-related protein SUMO to the yeast septins. *J Cell Biol* 147(5): 981-94.
277. Weirich, C. S., Erzberger, J. P. & Barral, Y. (2008). The septin family of GTPases: architecture and dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 478-489.
278. Hagiwara A, Tanaka Y, Hikawa R, Morone N, Kusumi A, Kimura H, Kinoshita M. Submembranous septins as relatively stable components of actin-based membrane skeleton. *Cytoskeleton (Hoboken)*. 2011 Sep;68(9):512-25. doi: 10.1002/cm.20528. Epub 2011 Aug 25.
279. Amir S, Golan M, Mabjeesh NJ. Targeted knockdown of SEPT9\_v1 inhibits tumor growth and angiogenesis of human prostate cancer cells concomitant with disruption of hypoxia-inducible factor-1 pathway. *Mol Cancer Res*. 2010 May;8(5):643-52. Epub 2010 Apr 20.
280. Amir S, Wang R, Simons JW, Mabjeesh NJ. SEPT9\_v1 up-regulates hypoxia-inducible factor 1 by preventing its RACK1-mediated degradation. *J Biol Chem*. 2009 Apr 24;284(17):11142-51. Epub 2009 Feb 26.
281. Kartmann B, Roth D. Novel roles for mammalian septins: from vesicle trafficking to oncogenesis. *J Cell Sci*. 2001 Mar;114(Pt 5):839-44.
282. Spiliotis, E. T. (2010). Regulation of microtubule organization and functions by septin GTPases. *Cytoskeleton (Hoboken)* 67(6): 339-45.
283. Kinoshita M. Assembly of mammalian septins. *J Biochem*. 2003 Oct;134(4):491-6.
284. Chung, C. D., Liao, J., Liu, B., Rao, X., Jay, P., Berta, P., and Shuai, K. (1997). Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science* 278, 1803-1805.
285. Arora, T., Liu, B., He, H., Kim, J., Murphy, T. L., Murphy, K. M., Modlin, R. L., and Shuai, K. (2003). PIASx is a transcriptional co-repressor of signal transducer and activator of transcription 4. *J Biol Chem* 278, 21327-21330.
286. Sharrocks AD. PIAS proteins and transcriptional regulation--more than just SUMO E3 ligases? *Genes Dev*. 2006 Apr 1;20(7):754-8. Review.
287. Takahashi Y, Kikuchi Y. Yeast PIAS-type Ull1/Siz1 is composed of SUMO ligase and regulatory domains. *J Biol Chem*. 2005 Oct 28; 280(43):35822-8. Epub 2005 Aug 17.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

288. Shuai, K. (2000) *Modulation of STAT signaling by STAT-interacting proteins. Oncogene, 19, 2638-2644.*
289. Jackson, P. K. (2001). *A new RING for SUMO: wrestling transcriptional responses into nuclear bodies with PIAS family E3 SUMO ligases. Genes Dev 15, 3053-3058.*
290. Rytinki MM, Kaikkonen S, Pehkonen P, Jääskeläinen T, Palvimo JJ. *PIAS proteins: pleiotropic interactors associated with SUMO. Cell Mol Life Sci. 2009 Sep;66(18):3029-41.*
- 291.302 Lau, J. Y., R. C. Tam, T. J. Liang, and Z. Hong. 2002. *Mechanism of action of ribavirin in the combination treatment of chronic HCV infection. Hepatology 35:1002-9.*
292. Poynard, T., M. F. Yuen, V. Ratziu, and C. L. Lai. 2003. *Viral hepatitis C. Lancet 362:2095-100.*
293. Folgori, A., S. Capone, L. Ruggeri, A. Meola, E. Sporeno, B. B. Ercole, M. Pezzanera, R. Tafi, M. Arcuri, E. Fattori, A. Lahm, A. Luzzago, A. Vitelli, S. Colloca, R. Cortese, and A. Nicosia. 2006. *A T-cell HCV vaccine eliciting effective immunity against heterologous virus challenge in chimpanzees. Nat Med 12:190-7.*
294. Youn, J. W., S. H. Park, D. Lavillette, F. L. Cosset, S. H. Yang, C. G. Lee, H. T. Jin, C. M. Kim, M. T. Shata, D. H. Lee, W. Pfahler, A. M. Prince, and Y. C. Sung. 2005. *Sustained E2 antibody response correlates with reduced peak viremia after hepatitis C virus infection in the chimpanzee. Hepatology 42:1429-36.*
295. Jia D, Wei L, Guo W, et al: *Genome-wide copy number analyses identified novel cancer genes in hepatocellular carcinoma. Hepatology 2011; 54: 1227 – 1236*
296. El-Serag HB. *Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. Gastroenterology. 2012 May;142(6):1264-1273.*
297. Georg M. Lauer, M.D., and Bruce . *Hepatitis C virus infection. July 5, 2001 N Engl J Med, Vol. 345, No. 1*
298. Eckner R, Ewen ME, Newsome D, Gerdes M, DeCaprio JA, Lawrence JB, et al. *Molecular cloning and functional analysis of the adenovirus E1A-associated 300-kD protein (p300) reveals a protein with properties of a transcriptional adaptor. Genes Dev 1994;8(8):869-884.*
299. Yang, X.J., Ogryzko. V., Nishikawa, J., Howard, B.H. and Nakatani, Y. (1996) *A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. Nature, 382, 319-324.*
300. Xu, W., Edmondson, D.G. and Roth, S.Y. (1998b) *Mammalian GCN5 and P/CAF acetyltransferases have homologous amino-terminal domains important for recognition of nucleosomal substrates. Mol Cell Biol, 18, 5659-5669.*

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

301. Puri, P.L., Sartorelli, V., Yang, X.J., Hamamori, Y., Ogryzko, V.V., Howard, B.H., Kedes, L., Wang, J.Y., Graessmann, A., Nakatani, Y. and Levrero, M. (1997) Differential roles of p300 and PCAF acetyltransferases in muscle differentiation. *Mol Cell*, 1, 35-45.
302. Blanco, J.C., Minucci, S., Lu, J., Yang, X.J., Walker, K.K., Chen, H., Evans, R.M., Nakatani, Y. and Ozato, K. (1998) The histone acetylase PCAF is a nuclear receptor coactivator. *Genes Dev.*, 12, 1638-1651.
303. Xu, L., Lavinsky, R.M., Dasen, J.S., Flynn, S.E., McInerney, E.M., Mullen, T.M., Heinzl, T., Szeto, D., Korzus, E., Kurokawa, R., Aggarwal, A.K., Rose, D.W., Glass, C.K. and Rosenfeld, M.G. (1998a) Signal-specific co-activator domain requirements for Pit-1 activation. *Nature*, 395, 301-306.
304. Hamamori, Y., Sartorelli, V., Ogryzko, V., Puri, P.L., Wu, H.Y., Wang, J.Y., Nakatani, Y. and Kedes, L. (1999) Regulation of histone acetyltransferases p300 and PCAF by the bHLH protein twist and adenoviral oncoprotein E1A. *Cell*, 96, 405-413.
305. Liu, L., Scolnick, D.M., Trievel, R.C., Zhang, H.B., Marmorstein, R., Halazonetis, T.D. and Berger, S.L. (1999) p53 sites acetylated in vitro by PCAF and p300 are acetylated in vivo in response to DNA damage. *Mol Cell Biol*, 19, 1202-1209.
306. Sartorelli, V., Puri, P.L., Hamamori, Y., Ogryzko, V., Chung, G., Nakatani, Y., Wang, J.Y. and Kedes, L. (1999) Acetylation of MyoD directed by PCAF is necessary for the execution of the muscle program. *Mol Cell*, 4, 725-734.
307. Dorr, A., Kiermer, V., Pedal, A., Rackwitz, H.R., Henklein, P., Schubert, U., Zhou, M.M., Verdin, E. and Ott, M. (2002) Transcriptional synergy between Tat and PCAF is dependent on the binding of acetylated Tat to the PCAF bromodomain. *Embo J*, 21, 2715-2723.
308. Goodman, R.H. and Smolik, S. (2000) CBP/p300 in cell growth, transformation, and development. *Genes Dev*, 14, 1553-1577.
309. Chan, H.M. and La Thangue, N.B. (2001) p300/CBP proteins: HATs for transcriptional bridges and scaffolds. *J Cell Sci*, 114, 2363-2373.
310. Ogryzko, V.V., Schiltz, R.L., Russanova, V., Howard, B.H. and Nakatani, Y. (1996) The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell*, 87, 953-959.
311. Giles, R.H., Peters, D.J. and Breuning, M.H. (1998) Conjunction dysfunction: CBP/p300 in human disease. *Trends Genet*, 14, 178-183.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

312. Trinchet JC, Alperovitch A, Bedossa P, Degos F, Hainaut P, Van Beers B. *Épidémiologie, prévention, dépistage et diagnostic du carcinome hépatocellulaire. Bull Cancer* 2009 ; 96 : 35-43.
313. Laurent-Puig P, Zucman-Rossi J. *Genetics of hepatocellular tumors. Oncogene* 2006 ; 25 : 3778-86.
314. Saffroy R, Pham P, Chiappini F, Gross-Goupil M, Castera L, Azoulay D, et al. *The MTHFR 677C > T polymorphism is associated with an increased risk of hepatocellular carcinoma in patients with alcoholic cirrhosis. Carcinogenesis* 2004; 25: 1443-8.
315. Sutton A, Nahon P, Pessayre D, Rufat P, Poire A, Ziol M, et al. *Genetic polymorphisms in antioxidant enzymes modulate hepatic iron accumulation and hepatocellular carcinoma development in patients with alcohol-induced cirrhosis. Cancer Res* 2006 ; 66 : 2844-52.
316. Nishimori H, Nishikawa R, Fujimaki T, Nakagomi T, Matsutani M, Huang HJ, et al. *Analysis of the p300/CBP-Associated Factor (PCAF) gene in astrocytic tumors. J Neurooncol* 2000; 46(1):17-22.
317. Haiman CA, Garcia RR, Hsu C, Xia L, Ha H, Sheng X, et al. *Screening and association testing of common coding variation in steroid hormone receptor co-activator and co-repressor genes in relation to breast cancer risk: the Multiethnic Cohort. BMC Cancer* 2009; 9(43).
318. Wirtenberger M, Tchatchou S, Hemminki K, Schmutzhard J, Sutter C, Schmutzler RK, et al. *Associations of genetic variants in the estrogen receptor coactivators PPARGC1A, PPARGC1B and EP300 with familial breast cancer. Carcinogenesis* 2006; 27(11):2201-2208.
319. Boulant, S., Douglas, M. W., Moody, L., Budkowska, A., Targett-Adams, P., and McLauchlan, J. (2008). *Hepatitis C virus core protein induces lipid droplet redistribution in a microtubule- and dynein-dependent manner. Traffic* 9, 1268-1282.
320. Bartz R, Li WH, Venables B, Zehmer JK, Roth MR, Welti R, Anderson RG, Liu P, Chapman KD. (2007). *Lipidomics reveals that adiposomes store ether lipids and mediate phospholipid traffic. J. Lipid Res.* 48:837–4720.
321. Johnson, E.S., Gupta AA. (2001). *an E3-like factor that promotes SUMO conjugaison to the yeast septins. Cell.* 2001 Sep 21; 106(6):735-44.
322. Zhu, J. L., Lin, S. L., Li, M., Ouyang, Y. C., Hou, Y., Schatten, H., and Sun, Q. Y. (2010). *Septin2 is modified by SUMOylation and required for chromosome congression in mouse oocytes. Cell Cycle* 9, 1607-1616.
323. Johnson, ES. (2004), *Protein modification by SUMO. Annu. Rev. Biochem.* 73, 355-382
324. Miyanari, Y., Atsuzawa, K., Usuda, N., Watashi, K., Hishiki, T., Zayas, M., Bartenschlager, R. Wakita, T., Hijikata, M., and Shimotohno, K. (2007). *The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. Nat Cell Biol.*, 9, 1089-1097.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

325. *Fartoux F, Chazouillères O, Wendum D, Poupon R, Serfaty L. Impact of steatosis on progression of fibrosis in patients with mold hepatitis C. Hepatology 2005 ; 41 : 82-7.*
326. *Jones CT, Murray CL, Eastman DK, Tassello J, Rice CM (2007) Hepatitis C virus p7 and NS2 proteins are essential for production of infectious virus. J Virol 81(16): 8374-8383*
327. *Grakoui A, McCourt DW, Wychowski C, Feinstone SM, Rice CM (1993) A second hepatitis C virus-encoded proteinase. Proc Natl Acad Sci U S A 90(22): 10583-10587.*
328. *Welbourn S, Green R, Gamache I, Dandache S, Lohmann V, Bartenschlager R, Meerovitch K, Pause A (2005) Hepatitis C virus NS2/3 processing is required for NS3 stability and viral RNA replication. J Biol Chem 280(33): 29604-29611.*
329. *Ferron, F., Bussetta, C., Dutartre, H. & Canard, B. (2005). The modeled structure of the RNA dependent RNA polymerase of GBV-C virus suggests a role for motif E in Flaviviridae RNA polymerases. BMC Bioinformatics 6, 255.*
330. *Stapleton, J. T., Fong, S., Muerhoff, A. S., Bukh, J. & Simmonds, P. (2010). The GB viruses: a review and proposed classification of GBV-A, GBV-C (HGV), and GBV-D in genus Pegivirus within the family Flaviviridae. Journal of General Virology 92, 233-246.*
331. *Epstein, J. H., Quan, P.-L., Briese, T., Street, C., Jabado, O., Conlan, S., Ali Khan, S., Verdugo, D., Hossain, M. J., & other authors. (2010). Identification of GBV-D, a novel GB-like flavivirus from old world frugivorous bats (*Pteropus giganteus*) in Bangladesh. PLoS Pathog 6, e1000972.*
332. *Shepard, C. W., Finelli, L. & Alter, M. J. (2005). Global epidemiology of hepatitis C virus infection. Lancet Infect Dis 5, 558-567.*
333. *Popescu, C.-I. & Dubuisson, J. (2010). Role of lipid metabolism in hepatitis C virus assembly and entry. Biol Cell 102, 63-74.*
334. *Zein, N. N. (2000). "Clinical significance of hepatitis C virus genotypes." Clin Microbiol Rev 13(2): 223-35.*
335. *Hengli TANG and Henry GRISE. (2009) Cellular and molecular biology of HCV infection and hepatitis. Clinical Science 117, 49–65.*
336. *Ploss, A., M. J. Evans, et al. (2009). "Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells." Nature 457(7231): 882-6.*



ANNEXES



## Associations of genetic variants in the transcriptional coactivators EP300 and PCAF with hepatocellular carcinoma

Abdellah Akil<sup>a,d</sup>, Sayeh Ezzikouri<sup>a</sup>, Abdellah Essaid El Feydi<sup>b</sup>, Mustapha Benazzouz<sup>b</sup>, Rajaa Afifi<sup>b</sup>, Ama Gassama Diagne<sup>c</sup>, Aziz Benjouad<sup>d</sup>, Anne Dejean<sup>e</sup>, Pascal Pineau<sup>e</sup>, Soumaya Benjelloun<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Viral Hepatitis Laboratory, Institut Pasteur du Maroc, Casablanca, Morocco

<sup>b</sup> Service de Médecine C, CHU Ibn-Sina, Rabat, Morocco

<sup>c</sup> INSERM, Unité 785, Université Paris Sud 11, Villejuif F-94800, France

<sup>d</sup> Laboratoire de Biochimie et d'Immunologie, Université Mohammed V, Rabat, Morocco

<sup>e</sup> Unité d'Organisation Nucléaire et Oncogénèse, INSERM U993, Institut Pasteur de Paris, Paris, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 29 February 2012

Received in revised form 14 May 2012

Accepted 22 May 2012

Available online 17 June 2012

#### Keywords:

EP300

PCAF

Liver cancer

Genetic susceptibility

Histone acetyltransferases

### ABSTRACT

**Background and aims:** Hepatocellular carcinoma (HCC) is a common cause of death by cancer worldwide. In Morocco, HCC is characterized by few mutations and a mild chromosome instability suggesting that epigenetic changes may represent the driving force of tumorigenesis in the region. Recently, three studies looked for an association between *EP300* or *PCAF* polymorphisms and cancer but there is a conspicuous lack of data regarding these histone acetyltransferase (HAT) variants and HCC development. The aim of the current study was to assess the impact of the Ile997Val in *EP300* and Asn386Ser in *PCAF* polymorphisms on the risk of HCC. **Materials and methods:** We performed a case–control study comparing 94 cases with HCC and 220 matching controls. Sequencing methods were used to determine the genotype at the Ile997Val and Asn386Ser on *EP300* and *PCAF*. **Results:** We found an overall association between genotypes Val/Val in *EP300* and HCC risk (OR, 3.03; 95% CI, 1.08–8.47;  $P = 0.028$ ). Population stratifications revealed a trend or significantly higher risks of HCC development for women and HCV-negative patients carrying the *EP300* Val/Val genotype (OR, 4.06; 95% CI, 0.71–23.36;  $P = 0.09$  and OR, 4.48; 95% CI, 1.04–19.14;  $P = 0.02$ , respectively). The *PCAF* Ser/Ser genotype at codon 386 was more frequent in HCC cases than in control group ( $P = 0.03$ ). We observed trends for higher risk of HCC among men and/or HCV-negative patients carrying Ser/Ser genotype when compared with controls (OR, 10.62; 95% CI, 0.50–225.13 and OR, 11.78; 95% CI, 0.47–295.56, respectively). **Conclusion:** It appears that variants of the transcriptional coactivator genes (*EP300* and *PCAF*) may influence HCC risk in populations with low mutations or chromosomal instability rates. Additional surveys are warranted to confirm this first report.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Primary liver cancer is the fifth most common cancer worldwide and the third most common cause of cancer mortality [1]. Hepatocellular carcinoma (HCC) accounts for 85–90% of all primary liver cancers. There are marked geographic variations in the distribution of HCC, with most cases occurring either in sub-Saharan Africa or in eastern Asia. Racial and ethnic variations in

incidence were observed even within the same geographic region [2]. The etiology of HCC is, thus, heterogeneous and complex. The principal risk factors include chronic infection with hepatitis B and C (HBV and HCV) viruses, dietary exposure to aflatoxin B1 (AFB1), heavy alcohol consumption and cirrhosis of any cause, as well as inherited metabolic diseases [2]. Although many individuals are exposed to these risk factors, HCC develops only in a small group of exposed people, implying that genetic and epigenetic factors might contribute to the carcinogenic mechanism, and that complex interactions between many genetic and environmental factors might be the major cause of HCC.

The adenoviral E1A-binding protein (EP300 or p300) is a transcriptional coactivator that has been implicated in a number of diverse biological functions [3,4]. As a histone acetyltransferase (HAT) [5,6], it regulates transcription via chromatin remodeling

\* Corresponding author at: Viral Hepatitis Laboratory, Institut Pasteur du Maroc, 1, Place Louis Pasteur, 20360 Casablanca, Morocco. Tel.: +212 5 22434470; fax: +212 5 22260957.

E-mail addresses: [abdellah.akil@u-psud.fr](mailto:abdellah.akil@u-psud.fr) (A. Akil), [soumaya.benjelloun@pasteur.ma](mailto:soumaya.benjelloun@pasteur.ma) (S. Benjelloun).

[7]. This gene plays an important role in cell proliferation and differentiation as well [8,9]. Thus, it functions as a transcriptional coactivator of nuclear hormone receptors, such as the estrogen receptors [10] and Peroxisome Proliferator-activated Receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) [11], and other DNA binding proteins, such as transcription factors and components of the RNA polymerase II holoenzyme complex [12,13]. A further important role of EP300 is the modulation of p53 pathway at multiple levels; it contributes to maintaining p53 stability by regulating its ubiquitination and degradation, through both mdm2-dependent and -independent mechanisms [14,15]. Furthermore, EP300 is required for p53-mediated transactivation of target genes through its coactivator function and acetylation of histones [16–18]. Moreover, it is implicated in the transcriptional regulation of p16INK4a and in the control of the cell cycle [19]. EP300 is located on chromosome 22q13.2 arm, which exhibits frequent loss of heterozygosity in a variety of malignancies including HCC. EP300 contains a G-to-A transition polymorphism in the coding sequence which changes the amino acid codon at 997 position from isoleucine (Ile) to valine (Val) (reference SNP rs20551), codon 997 maps closely upstream of the bromodomain responsible of HAT activity and in a region of interaction with JMY, a cofactor known to increase p53-dependent transcription and apoptosis [20].

P/CAF (p300/CBP Associating Factor or KAT2B) was originally identified as a p300/CBP-binding protein due to its sequence similarity to the yeast GCN5 (yGCN5) [21]. Relevant to P/CAF function is the fact that it binds to the same site on p300/CBP as does adenoviral oncoprotein E1A, and competition between these two proteins was observed [8]. Interestingly, transfected P/CAF and E1A had opposite effects on cell cycle regulation, suggesting that P/CAF has a role in inhibiting cell cycle progression and that E1A's mitogenic activity may occur by disrupting the interaction between P/CAF and p300/CBP [8]. Furthermore, the role of P/CAF in transcription has been investigated by multiple studies, and its requirement as a HAT and coactivator has been described for myogenesis [22], nuclear receptor mediated [23,24], and growth factor-signaled [25] activation, among other processes. It also may have a role in DNA damage response and apoptosis due to its ability to acetylate p53, E2F1, and Ku70 [26–28]. Although P/CAF is a nuclear protein, its nuclear localization was reported to change in response to intra- or extracellular signals [29,30]. In summary P/CAF was identified via its ability to interact with p300/CBP and, importantly, the association between p300/CBP and P/CAF is required for transcriptional activation of many genes [21,31]. EP300 and P/CAF are, thus, genes with a strong biological relevance for carcinogenesis, which makes them good candidates as HCC susceptibility genes. In previous studies, we have reported that several polymorphisms are associated with an increased risk of HCC in Moroccan population [32–36]. In North-Africa, however, chromosome instability in HCC is mild, suggesting that epigenetic alterations may be the primary mechanism driving liver tumorigenesis [37]. To our knowledge, two association studies about Ile997Val EP300 polymorphism in breast cancer are available [38,39]. These previous works yielded conflicting results as a lack of association between Ile997Val EP300 and sporadic breast cancer was found in a series of European patients whereas a protective role of valine variant was detected in an American series of estrogen-positive tumors. No report explored, however, this coding SNP in HCC. Finally, a preliminary analysis reporting Asn386Ser P/CAF genotyping on 74 gliomas and 31 controls was published by a Japanese group without any significant findings [40]. Despite intermediate levels of chronic hepatitis B and C in the general population (2 and 1% respectively) in Morocco, liver cancer incidence is particularly low in Morocco (1.3/105 ASR, according to Globocan 2008). We wonder whether epigenetic changes

affecting Moroccan patients could differ qualitatively from what is commonly observed in countries with higher incidence of liver cancer. Based on the important role that histone acetylation plays in various tumor process [41,42], we hypothesized that polymorphisms in these genes may influence the susceptibility to HCC. To test this hypothesis, we investigated the potential association between Ile997Val and Asn386Ser polymorphisms and the risk of HCC in Moroccan population.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Study population

This case–control study included 94 patients with HCC and 220 cancer-free controls as described previously [35]. Briefly, the cases were recruited from Hospital University Center Ibn-Sina, Service of Medicine C, Rabat. For each patient, pathological diagnostics were established by hematoxylin–eosin staining. All subjects were recruited in Western-Central Morocco (Rabat and Casablanca) in a population of mixed berberic and arabic ethnicity. Each patient was matched for sex and age ( $\pm 5$  years) with at least two controls. The control populations consisted in two subsets of individuals never previously diagnosed with any type of cancer. The first subset was formed with 161 healthy subjects devoid of any liver disease recruited at the Pasteur institute. A second subset of 58 subjects with HCV infection but without HCC was added to control group. Before inclusion, the procedures and purposes of the study were explained to all the subjects. After informed consent was obtained, each participant was interviewed, and a structured questionnaire exploring demographic features and selected risk factors was filled out by interviewers. These investigations, respectful of the declaration of Helsinki, were approved by the Ethics Committee of the Faculté de Medicine of Casablanca.

Serological markers for hepatitis viruses were tested with commercially available kits (AxSYM, Abbott Diagnostics, Germany). Hepatitis B virus surface antigen (HBsAg), hepatitis B early antigen (HBeAg), anti-HBe, anti-HBc IgG, anti-HBsAg and anti-hepatitis C virus (anti-HCV) were searched for HCC patients whereas HBsAg and anti-HCV were tested in control subjects.

### 2.2. Genotyping

EP300 and P/CAF were analyzed for SNPs using direct sequencing. SNPs in EP300 and P/CAF were derived from the NCBI (SNP database), all the primers were designed by the DNA strider system. PCR was carried out in a final volume of 25  $\mu$ l, containing 50 ng of genomic DNA, 20 pmol/ $\mu$ l of each primer, 0.5 U of Taq DNA polymerase (Invitrogen, France), 200  $\mu$ M of each dNTP and 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>. A step-down amplification was performed at annealing temperature of 52 °C for analysis of Ile997Val of EP300 using a primer pair (forward 5'-TTTCCCAGC-CAGCTGTAAGC-3', reverse 5'-CATGCAAAATCTATGCCATG-3') and P/CAF Asn386Ser polymorphism was amplified with primers 5'-TGATGCCTTGTGGCTTATGT-3' and 5'-GGAGTCCTGGAG-CAAGTCA-3'. For the negative control, molecular biology water was used instead of template DNA in the reaction system in each panel of PCRs. PCR products were purified by using the Exonuclease I/Shrimp Alkaline Phosphatase (GE Healthcare) and sequenced using Big Dye Terminator version 3.1 kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) and run on an ABI automated fluorescent 3130 DNA sequencer. Sequencing data were analyzed using SeqScape v2.5 software (Applied Biosystems). The SNP assays were validated by re-sequencing of 15% of all samples.

### 2.3. Predicting the effect of missense SNPs on protein function using Hidden Markov Model

We used the PANTHER/LIB Hidden Markov Model [43] as a statistical method to predict the functional consequence of *EP300* Ile997Val and *PCAF* Asn386Ser polymorphisms. We can then score the likelihood of a single amino acid at a particular position (amino acid PSEC or aaPSEC). When aaPSEC = 0, this is the evolutionarily most common allele (inferred to be definitely functional), whereas more negative values of aaPSEC indicate that the allele is less likely to be observed across evolution (inferred to be less likely to conserve function). The substitution PSEC score is simply the difference between the aaPSEC scores for the two alleles. When subPSEC = 0, the substitution is interpreted as functionally neutral, whereas more negative values of subPSEC predict more deleterious substitutions.

### 2.4. Statistical analysis

Chi<sup>2</sup>-test is used to assess whether the genotypes were in Hardy–Weinberg equilibrium and to determine *P* values for differences in genotype frequencies between cases and controls. The association between the genotypes and the disease was examined by using conditional and unconditional logistic regression to calculate odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (CIs). All ORs were adjusted for age, sex and HCV infection, where it was appropriate. We tested the null hypotheses of multiplicative gene–gene interaction and evaluated departures from multiplicative joint effect models by including main effect variables and their product terms in the logistic regression model. All statistical tests were two-sided and a *P*-value of less than 0.05 was used as the criterion of statistical significance.

## 3. Results

Overall, 94 HCC cases and their 220 controls were analyzed for Ile997Val in *EP300* and Asn386Ser in *PCAF* polymorphisms. The general characteristics of the cases and controls are shown in Table 1.

1. No significant differences were found in the distributions of age and sex between cases and controls, which suggest adequate matching based on these variables. Chronic hepatitis C was the main risk factor in the population studied as HCV-targeted antibodies were present in 56.2% of the cases. HBV surface antigen was present in 15.9% of cases. For 15% of the samples, sequencing was repeated for quality control. The results of re-sequencing were 100% concordant with the initial screening.

The frequency of the polymorphism resulting in Ile997Val substitution in the *EP300* among controls and cases is shown in Table 1. The genotype distribution in controls was in Hardy–Weinberg equilibrium (*P* = 0.635) but not in the cases (*P* = 0.002). The frequencies of the three genotypes were as follows: Ile/Ile 69.1%, Ile/Val 21.3% and Val/Val 9.6% in HCC cases and Ile/Ile 69.5%, Ile/Val 27.3% and Val/Val 3.2% in controls respectively. Based on these data, the frequencies for Ile and Val alleles were 79.8% and 20.2% in HCC cases vs. 83.2% and 16.8% in controls, respectively. Subjects with Val/Val genotype had a 3-fold increased risk for HCC development (OR, 3.026; 95% CI, 1.081–8.473; *P* = 0.028). Under the recessive model of inheritance, the Val/Val genotype was associated with an increased risk for HCC with an odds ratio higher than dominant model (adjusted OR, 3.184; 95% CI, 1.189–8.523; *P* = 0.026 vs. OR, 1.019; 95% CI, 0.604–1.720.62; *P* = 0.944, respectively), after adjustment for age and virus infections in the multivariate logistic regression analysis (Table 1).

The Ile997Val *EP300* genotype distributions in the HCC patients and controls stratified by HCV infection and gender status are shown in Fig. 1 and Table 2. There was no significant correlation between HCC and Ile997Val when HCV-positive cases and HCV-positive controls were compared (*P* = 0.479). However, there was an overall significant difference in genotype distribution between HCV-negative cases and HCV negative controls (*P* = 0.029). HCV-negative patients who were homozygotes for the Val allele had a 4-fold increase in risk for development of HCC (OR, 4.480; 95% CI, 1.049–19.140) (Fig. 1). Subgroup analysis revealed that the effect was potentially higher among women than men. Indeed, Val/Val carrying female patients had a non significant odds ratio of 4 (*P* = 0.09, Table 2).

**Table 1**  
Characteristics and association between *EP300* Ile997Val and *PCAF* Asn386Ser polymorphisms and risk of hepatocellular carcinoma.

|                         | HCC patients (N=94) | Controls (N=220) | OR (95% CI) <sup>a</sup> | <i>P</i> -value |
|-------------------------|---------------------|------------------|--------------------------|-----------------|
| Age (mean ± SD years)   | 60.37 ± 12.68       | 56.67 ± 9.45     |                          | 0.578           |
| Sex ratio (male/female) | 1.35                | 1.36             |                          | 1.000           |
| HBsAg positive          | 15 (15.9%)          | 7 (3.2%)         |                          | 0.001           |
| Anti-HCV positive       | 55 (56.2%)          | *                |                          | 0.0001          |
| Hepatitis B and C       | 5 (5.1%)            | 1 (0.4%)         |                          | 0.011           |
| Alcoholic               | 3 (3.1%)            | 3 (1.3%)         |                          | 0.375           |
| NIDDM <sup>b</sup>      | 8 (8.2%)            | 3 (1.3%)         |                          | 0.004           |
| <b>EP300 Ile997Val</b>  |                     |                  |                          |                 |
| Ile/Ile                 | 65 (69.1)           | 153 (69.5)       | 1.00                     |                 |
| Ile/Val                 | 20 (21.3)           | 60 (27.3)        | 0.78 (0.44–1.41)         | 0.414           |
| Val/Val                 | 9 (9.6)             | 7 (3.2)          | 3.03 (1.08–8.47)         | 0.028           |
| Allelic frequency       |                     |                  |                          |                 |
| Ile                     | 0.798 ± 0.0339      | 0.832 ± 0.0181   | 1.00                     | 0.309           |
| Val                     | 0.202 ± 0.0339      | 0.168 ± 0.0181   | 1.25 (0.81–1.94)         |                 |
| <b>PACF Asn386Ser</b>   |                     |                  |                          |                 |
| Asn/Asn                 | 88 (93.6)           | 194 (88.2)       | 1.00                     |                 |
| Asn/Ser                 | 4 (4.3)             | 26 (11.8)        | 0.34 (0.11–1.00)         | 0.041           |
| Ser/Ser                 | 2 (2.1)             | 0 (0)            | 10.99 (0.52–231.28)      | 0.037           |
| Allelic frequency       |                     |                  |                          |                 |
| Asn                     | 0.957 ± 0.017       | 0.941 ± 0.010    | 1.00                     |                 |
| Ser                     | 0.043 ± 0.017       | 0.059 ± 0.010    | 0.708 (0.314–1.593)      | 0.401           |

<sup>a</sup> Multivariate analysis adjusted for age, sex, HBV and HCV infection.

<sup>b</sup> Non-insulin-dependent diabetes mellitus.

\* The prevalence of anti-HCV antibodies is only 1.2% when we consider only the subset of healthy individuals (*n* = 2/161, *P* < 0.0001).

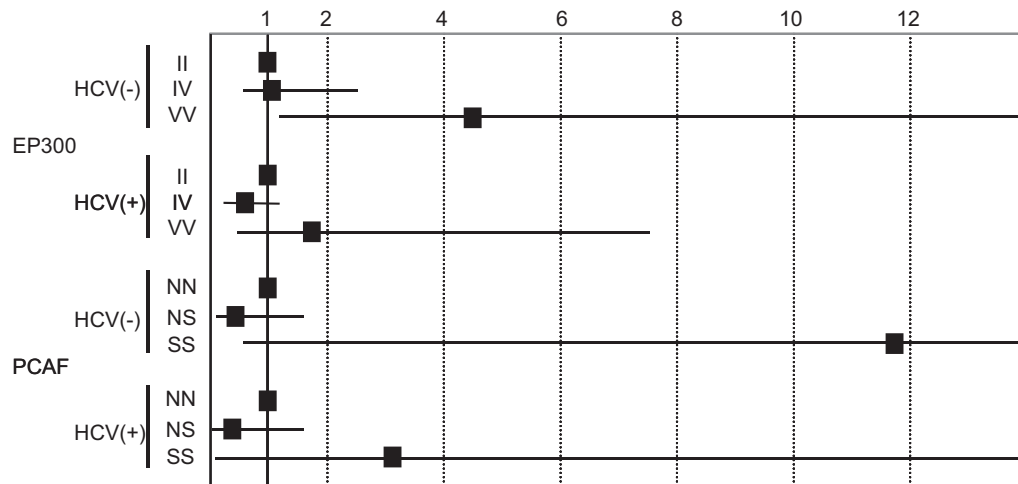


Fig. 1. EP300 Ile997Val and PCAF Asn386Ser genotypes and associated odds ratio according to HCV infection status (I, Ile; S, Ser).

Table 2

Distribution of EP300 Ile997Val and PCAF Asn386Ser genotypes and associated odds ratio in relation to sex.

| Gender                 | Genotype | HCC,<br><i>n</i> (%) | Controls,<br><i>n</i> (%) | OR (95% CI) <sup>a</sup> | <i>P</i> -value |
|------------------------|----------|----------------------|---------------------------|--------------------------|-----------------|
| <b>EP300 Ile997Val</b> |          |                      |                           |                          |                 |
| Male                   | Ile/Ile  | 33 (35.1)            | 88 (40)                   | 1.00                     | 0.534           |
|                        | Ile/Val  | 16 (17)              | 34 (15.5)                 | 1.25 (0.61–2.57)         |                 |
|                        | Val/Val  | 5 (5.3)              | 5 (2.3)                   | 2.67 (0.72–9.81)         |                 |
| Female                 | Ile/Ile  | 32 (34)              | 65 (29.5)                 | 1.00                     | 0.037           |
|                        | Ile/Val  | 4 (4.3)              | 26 (11.8)                 | 0.31 (0.10–0.97)         |                 |
|                        | Val/Val  | 4 (4.3)              | 2 (0.9)                   | 4.06 (0.71–23.36)        |                 |
| <b>PCAF Asn386Ser</b>  |          |                      |                           |                          |                 |
| Male                   | Asn/Asn  | 52 (55.3)            | 111 (50.4)                | 1.00                     | 0.007           |
|                        | Asn/Ser  | 0 (0)                | 16 (7.3)                  | 0.06 (0.004–1.09)        |                 |
|                        | Ser/Ser  | 2 (2.1)              | 0 (0)                     | 10.62 (0.50–225.13)      |                 |
| Female                 | Asn/Asn  | 36 (38.3)            | 83 (37.7)                 | 1.00                     | 0.896           |
|                        | Asn/Ser  | 4 (4.2)              | 10 (4.5)                  | 0.92 (0.271–3.135)       |                 |
|                        | Ser/Ser  | 0 (0)                | 0 (0)                     | 2.29 (0.04–117.53)       |                 |

<sup>a</sup> Adjusted for age, HBV and HCV infection.

We analyzed the PCAF Asn386Ser polymorphism in HCC cases and controls by sequencing. The genotype and allele distribution of the Asn386Ser polymorphism are shown in Table 1. The distributions of the PCAF Asn386Ser genotype among the controls were in Hardy–Weinberg equilibrium ( $P = 1.00$ ). The genotype frequencies were 88.2% (Asn/Asn), 11.8% (Asn/Ser) and 0% (Ser/Ser), respectively, among the controls, which were significantly different from those of HCC (93.6% Asn/Asn, 4.3% Asn/Ser and 2.1% Ser/Ser). The Ser/Ser genotype was more frequent in the HCC cases than in controls (2.1% vs. 0%,  $P = 0.037$ ). Multivariate logistic regression analyses revealed that compared with the Asn/Asn genotype, the ORs for HCC patients carrying the Asn/Ser, Ser/Ser

and Asn/Ser + Ser/Ser genotypes were 0.339 (95% CI, 0.115–1.001), 10.989 (95% CI, 0.522–231.276) and 1.02 (95% CI, 0.61–1.69), respectively. The PCAF Asn386Ser genotype distributions in HCC cases and controls stratified by HCV infection status and gender are shown in Fig. 1 and Table 2. Ser/Ser genotype carriers without HCV infection display a strong trend toward an increased risk of HCC (OR, 11.7; 95% CI, 0.470–295.560; NS; Table 3). Similarly, gender analysis revealed that the impact of Ser/Ser polymorphism was stronger among men. The odds ratio for HCC risk was 10.62 (95% CI, 0.500–225.130) compared with Asn/Asn-carrying male patients.

Gene–gene interactions between the EP300 and PCAF polymorphisms were examined (Table 3). We found that the patients carrying the EP300 Val/Val genotype were also more frequently carrying the PCAF Asn/Ser genotype than the controls (3.19 vs. 0%,  $P = 0.012$ ). Adjusted ORs (95% CI) for the presence of HCC were obtained by logistic regression. Both Val/Val/Asn/Ser and Ile/Ile/Ser/Ser combinations were associated with a higher, albeit non significant, risk of HCC (adjusted OR, 14.84; 95% CI, 0.761–293.894 and OR, 10.68; 95% CI, 0.500–225.780, respectively). These results indicate a possible joint effect between the EP300 Ile/Ile and PCAF Ser/Ser genotype and EP300 Val/Val and PCAF Asn/Ser genotype in intensifying the risk of developing HCC.

Trying to predict the functional consequence of EP300 Ile997Val and PCAF Asn386Ser polymorphisms using PANTHER/LIB HMMs [43], we found that the Asn to Ser change in PCAF protein may possibly be a functional SNP (subPSEC =  $-4.52$ ) by changing a medium size polar residue for a small one. By contrast, the Ile to Val change in EP300 protein was apparently not deleterious (subPSEC =  $-1.83$ ) as both residues were medium size and hydrophobic. This result, in apparent contradiction with the pathogenic role of each variant in HCC, indicates that HMM may be used with caution and should be modulated by clinical observations.

Table 3

Risk of HCC for combinations of EP300 and PCAF genotypes.

| EP300 Ile997Val | PCAF Asn386Ser | HCC, n (%) | Controls, n (%) | OR (95% CI) <sup>a</sup> | P-value |
|-----------------|----------------|------------|-----------------|--------------------------|---------|
| Ile/Ile         | Asn/Asn        | 62 (15.30) | 133 (14.41)     | 1.00                     | 0.009   |
| Ile/Ile         | Asn/Ser        | 1 (8.16)   | 20 (17.12)      | 0.11 (0.01–0.82)         |         |
| Ile/Ile         | Ser/Ser        | 2 (1.02)   | 0 (7.14)        | 10.68 (0.50–225.78)      |         |
| Ile/Val         | Asn/Asn        | 20 (25.51) | 54 (25.22)      | 0.79 (0.44–1.44)         | 0.448   |
| Ile/Val         | Asn/Ser        | 0 (15.31)  | 6 (14.86)       | 0.16 (0.01–2.96)         |         |
| Ile/Val         | Ser/Ser        | 0 (4.08)   | 0 (6.31)        | 2.14 (0.04–108.89)       |         |
| Val/Val         | Asn/Asn        | 6 (12.24)  | 7 (9)           | 1.839 (0.59–5.70)        | 0.285   |
| Val/Val         | Asn/Ser        | 3 (3.19)   | 0 (0)           | 14.95 (0.76–293.89)      |         |
| Val/Val         | Ser/Ser        | 0 (9.18)   | 0 (2.25)        | 2.14 (0.04–108.89)       |         |

<sup>a</sup> Multivariate analysis adjusted for age, sex, HBV and HCV infection.



#### 4. Discussion

The input of germline variations in HCC etiology and most other cancers remains unclear and it has been hypothesized that common genetic variants (low penetrance genes) with modest but cumulative effects on disease susceptibility cause the bulk of unexplained risk [44]. It has been demonstrated that SNPs altering primary sequences of proteins can affect the functions of proteins and in turn influence the individual susceptibility to cancers [45]. *EP300* and *PCAF* are genes with a strong biological relevance for carcinogenesis, which makes them potential candidates as HCC susceptibility genes. We found that the frequency of Val/Val genotype at the position 997 in *EP300* gene was significantly higher in HCC patients compared with controls. This result suggested that the presence of Val/Val genotype at position 997 in *EP300* gene was likely to be associated with the development of HCC. By contrast, previous studies reporting about the role of *EP300* Ile997Val in familial and sporadic breast cancers have different outcomes [38,39]. One of these studies reported a protective role for Ile997Val in estrogen receptor-positive breast cancer whereas no effect was detected in a European series of sporadic breast cancers [38,39]. Cancer histotypes as well as ethnic and/or environmental differences may plausibly explain these conflicting results. Curiously, the association between the Ile997Val genotypes and the risk of HCC examined after stratification according to gender revealed that the effect of the *EP300* variant on HCC development was, albeit without reaching the significant threshold, potentially much higher in women than men. Indeed, women patients, carrying Val/Val genotype, had odds ratio of 4. This preliminary finding deserves of course further investigation to be statistically validated but it suggests that chromatin remodeling complex (incl. HAT proteins) composition and/or activity may widely differ from a diseased tissue to another. More importantly, we found that patients codon 997 Ile/Ile carriers non-infected with HCV are at increased risk to develop primary liver cancer (OR, 4.48) when compared with patients infected with the virus (OR, 1.71). It is well known that HCV-induced liver tumorigenesis relies on continuous inflammation/cytokines pathway activation [46]. Our data suggest, that in absence of hepatitis C, liver tumorigenesis may follow an utterly different process depending on germline alterations affecting chromatin remodeling apparatus.

To our knowledge, a single study examined the *PCAF* Asn386Ser polymorphism in cancer. In a limited cohort of Japanese gliomas and controls, Nishimori and coworkers did not detect any significant difference [40]. In the present study we found that the frequency of the Ser/Ser genotype, although still rather low, was significantly higher in HCC patients than controls (2.1% vs. 0%,  $P = 0.037$ ). Amazingly, the frequency of the heterozygous form decreased in HCC patients with regard to controls (4.2% vs. 11.8%,  $P = 0.041$ ). When we carried out subgroups analyses (i.e. genders and presence/absence of HCV), we obtain similar results. More specifically, male patients and patients uninfected with HCV display a trend to be at increased risk of HCC when compared with women or patients with hepatitis C. However, in each case, confidence interval was indicating that random variations in populations could explain the differences observed. These inconsistent results indicate merely that a substantial increase in the power of future genetic studies is necessary to get solid conclusions.

In conclusion, we found that the Val/Val of the *EP300* at codon 997 and Ser/Ser of the *PCAF* at codon 386 were associated with an increased risk of HCC in the Moroccan population. A higher risk of HCC was observed in HCV-negative subjects. We also found that male with Ser/Ser in the *PCAF* gene and women with Val/Val genotype of the *EP300* had a higher risk to develop HCC. The potential association of HAT polymorphisms with the sex of the

patients represents an interesting molecular clue. It is well known that HATs participate with nuclear hormone receptors to the functioning of the Nuclear Coactivator (NCoA) complex to control the expression of many involved in proliferation and differentiation. Our findings represent, thus, a rationale to explore the activity of NCoA complex loaded with different variants of HATs. We are, however, fully aware that some aspects clearly warrant further investigations. In summary, future analyses of above mentioned and additional polymorphisms and haplotypes in histone acetylation genes within large pooled studies will help to clarify their role in hepatocarcinogenesis and may provide a mechanism for the relationship between histone acetylation and HCC.

#### Conflict of interest statement

The authors who have taken part in this study declared that they do not have any financial disclosure or conflict of interest with respect to this manuscript.

#### Acknowledgments

The authors would like to acknowledge all patients for their participation in this study. This work was supported by Pasteur Institute of Morocco and the Pasteur Institutes International Network (RIIP).

#### References

- [1] Parkin DM. Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol* 2001;2(9):533–43.
- [2] McGlynn KA, London WT. Epidemiology and natural history of hepatocellular carcinoma. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2005;19(1):3–23.
- [3] Eckner R, Ewen ME, Newsome D, Gerdes M, DeCaprio JA, Lawrence JB, et al. Molecular cloning and functional analysis of the adenovirus E1A-associated 300-kD protein (p300) reveals a protein with properties of a transcriptional adaptor. *Genes Dev* 1994;8(8):869–84.
- [4] Giordano A, Avantiaggiati ML. p300 and CBP: partners for life and death. *J Cell Physiol* 1999;181(2):218–30.
- [5] Bannister AJ, Kouzarides T. The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature* 1996;384(6610):641–3.
- [6] Ogryzko VV, Schiltz RL, Russanova V, Howard BH, Nakatani Y. The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell* 1996;87(5):953–9.
- [7] Grunstein M. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* 1997;389(6649):349–52.
- [8] Kawasaki H, Eckner R, Yao TP, Taira K, Chiu R, Livingston DM, et al. Distinct roles of the co-activators p300 and CBP in retinoic-acid-induced F9-cell differentiation. *Nature* 1998;393(6682):284–9.
- [9] Yao TP, Oh SP, Fuchs M, Zhou ND, Ch'ng LE, Newsome D, et al. Gene dosage-dependent embryonic development and proliferation defects in mice lacking the transcriptional integrator p300. *Cell* 1998;93(3):361–72.
- [10] Hanstein B, Eckner R, DiRenzo J, Halachmi S, Liu H, Searcy B, et al. p300 is a component of an estrogen receptor coactivator complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(21):11540–45.
- [11] Camp HS, Li O, Wise SC, Hong YH, Frankowski CL, Shen X, et al. Differential activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma by troglitazone and rosiglitazone. *Diabetes* 2000;49(4):539–47.
- [12] Jacobson S, Pillus L. Modifying chromatin and concepts of cancer. *Curr Opin Genet Dev* 1999;9(2):175–84.
- [13] Kouzarides T. Histone acetylases and deacetylases in cell proliferation. *Curr Opin Genet Dev* 1999;9(1):40–8.
- [14] Grossman SR, Deato ME, Brignone C, Chan HM, Kung AL, Tagami H, et al. Polyubiquitination of p53 by a ubiquitin ligase activity of p300. *Science* 2003;300(5617):342–4.
- [15] Grossman SR, Perez M, Kung AL, Joseph M, Mansur C, Xiao ZX, et al. p300/MDM2 complexes participate in MDM2-mediated p53 degradation. *Mol Cell* 1998;2(4):405–15.
- [16] Avantiaggiati ML, Ogryzko V, Gardner K, Giordano A, Levine AS, Kelly K. Recruitment of p300/CBP in p53-dependent signal pathways. *Cell* 1997;89(7):1175–84.
- [17] Espinosa JM, Emerson BM. Transcriptional regulation by p53 through intrinsic DNA/chromatin binding and site-directed cofactor recruitment. *Mol Cell* 2001;8(1):57–69.
- [18] Lill NL, Grossman SR, Ginsberg D, DeCaprio J, Livingston DM. Binding and modulation of p53 by p300/CBP coactivators. *Nature* 1997;387(6635):823–7.
- [19] Wang X, Pan L, Feng Y, Wang Y, Han Q, Han L, et al. P300 plays a role in p16(INK4a) expression and cell cycle arrest. *Oncogene* 2008;27(13):1894–904.

- [20] Coutts AS, La Thangue NB. The p53 response: emerging levels of co-factor complexity. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;331(3):778–85.
- [21] Yang XJ, Ogryzko VV, Nishikawa J, Howard BH, Nakatani Y. A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. *Nature* 1996;382(6589):319–24.
- [22] Puri PL, Sartorelli V, Yang XJ, Hamamori Y, Ogryzko VV, Howard BH, et al. Differential roles of p300 and PCAF acetyltransferases in muscle differentiation. *Mol Cell* 1997;1(1):35–45.
- [23] Blanco JC, Minucci S, Lu J, Yang XJ, Walker KK, Chen H, et al. The histone acetylase PCAF is a nuclear receptor coactivator. *Genes Dev* 1998;12(11):1638–51.
- [24] Korzus E, Torchia J, Rose DW, Xu L, Kurokawa R, McInerney EM, et al. Transcription factor-specific requirements for coactivators and their acetyltransferase functions. *Science* 1998;279(5351):703–7.
- [25] Xu L, Lavinsky RM, Dasen JS, Flynn SE, McInerney EM, Mullen TM, et al. Signal-specific co-activator domain requirements for Pit-1 activation. *Nature* 1998;395(6699):301–6.
- [26] Chao C, Wu Z, Mazur SJ, Borges H, Rossi M, Lin T, et al. Acetylation of mouse p53 at lysine 317 negatively regulates p53 apoptotic activities after DNA damage. *Mol Cell Biol* 2006;26(18):6859–69.
- [27] Cohen HY, Lavu S, Bitterman KJ, Hekking B, Imahiyerobo TA, Miller C, et al. Acetylation of the C terminus of Ku70 by CBP and PCAF controls Bax-mediated apoptosis. *Mol Cell* 2004;13(5):627–38.
- [28] Martinez-Balbas MA, Bauer UM, Nielsen SJ, Brehm A, Kouzarides T. Regulation of E2F1 activity by acetylation. *EMBO J* 2000;19(4):662–71.
- [29] Gregoire S, Xiao L, Nie J, Zhang X, Xu M, Li J, et al. Histone deacetylase 3 interacts with and deacetylates myocyte enhancer factor 2. *Mol Cell Biol* 2007;27(4):1280–95.
- [30] Wong K, Zhang J, Awasthi S, Sharma A, Rogers L, Matlock EF, et al. Nerve growth factor receptor signaling induces histone acetyltransferase domain-dependent nuclear translocation of p300/CREB-binding protein-associated factor and hGCN5 acetyltransferases. *J Biol Chem* 2004;279(53):55667–74.
- [31] Chen H, Lin RJ, Schiltz RL, Chakravarti D, Nash A, Nagy L, et al. Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300. *Cell* 1997;90(3):569–80.
- [32] Ezzikouri S, El Feydi AE, Afifi R, Benazzouz M, Hassar M, Pineau P, et al. Polymorphisms in antioxidant defence genes and susceptibility to hepatocellular carcinoma in a Moroccan population. *Free Radic Res* 2010;44(2):208–16.
- [33] Ezzikouri S, El Feydi AE, Afifi R, El Kihal L, Benazzouz M, Hassar M, et al. MDM2 SNP309T>G polymorphism and risk of hepatocellular carcinoma: a case-control analysis in a Moroccan population. *Cancer Detect Prev* 2009;32(5–6):380–5.
- [34] Ezzikouri S, El Feydi AE, Benazzouz M, Afifi R, El Kihal L, Hassar M, et al. Single nucleotide polymorphism in DNMT3B promoter and its association with hepatocellular carcinoma in a Moroccan population. *Infect Genet Evol* 2009;9(5):877–81.
- [35] Ezzikouri S, El Feydi AE, Chafik A, Afifi R, El Kihal L, Benazzouz M, et al. Genetic polymorphism in the manganese superoxide dismutase gene is associated with an increased risk for hepatocellular carcinoma in HCV-infected Moroccan patients. *Mutat Res* 2008;649(1–2):1–6.
- [36] Ezzikouri S, El Feydi AE, Chafik A, Benazzouz M, El Kihal L, Afifi R, et al. The Pro variant of the p53 codon 72 polymorphism is associated with hepatocellular carcinoma in Moroccan population. *Hepatol Res* 2007;37(9):748–54.
- [37] Pineau P, Ezzikouri S, Marchio A, Benazzouz M, Cordina E, Afifi R, et al. Genomic stability prevails in North-African hepatocellular carcinomas. *Dig Liver Dis* 2007;39(7):671–7.
- [38] Haiman CA, Garcia RR, Hsu C, Xia L, Ha H, Sheng X, et al. Screening and association testing of common coding variation in steroid hormone receptor co-activator and co-repressor genes in relation to breast cancer risk: the Multiethnic Cohort. *BMC Cancer* 2009;9(43).
- [39] Wirtenberger M, Tchatchou S, Hemminki K, Schmutzhard J, Sutter C, Schmutzler RK, et al. Associations of genetic variants in the estrogen receptor coactivators PPARGC1A, PPARGC1B and EP300 with familial breast cancer. *Carcinogenesis* 2006;27(11):2201–8.
- [40] Nishimori H, Nishikawa R, Fujimaki T, Nakagomi T, Matsutani M, Huang HJ, et al. Analysis of the p300/CBP-Associated Factor (PCAF) gene in astrocytic tumors. *J Neurooncol* 2000;46(1):17–22.
- [41] Kurdistani SK. Histone modifications in cancer biology and prognosis. *Prog Drug Res* 2010;67:91–106.
- [42] Sawan C, Herczeg Z. Histone modifications and cancer. *Adv Genet* 2010;70:57–85.
- [43] Thomas PD, Campbell MJ, Kejariwal A, Mi H, Karlak B, Daverman R, et al. PANTHER: a library of protein families and subfamilies indexed by function. *Genome Res* 2003;13(9):2129–41.
- [44] Zondervan KT, Cardon LR. The complex interplay among factors that influence allelic association. *Nat Rev Genet* 2004;5(2):89–100.
- [45] Robert J. Gene polymorphisms. *Bull Cancer* 2010;97(11):1253–64.
- [46] Castello G, Scala S, Palmieri G, Curley SA, Izzo F. HCV-related hepatocellular carcinoma: from chronic inflammation to cancer. *Clin Immunol* 2010;134(3):237–50.



## Morocco underwent a drift of circulating hepatitis C virus subtypes in recent decades

Ikram Brahim · Abdelah Akil · El Mostafa Mtairag · Régis Pouillot ·  
Abdelouhad El Malki · Salwa Nadir · Rhimou Alaoui · Richard Njouom ·  
Pascal Pineau · Sayeh Ezzikouri · Soumaya Benjelloun

Received: 29 June 2011 / Accepted: 1 December 2011 / Published online: 11 December 2011  
© Springer-Verlag 2011

**Abstract** Hepatitis C virus (HCV) isolates circulating in Morocco are poorly documented. To determine the subgenotype distribution of HCV in chronically infected patients, serum samples from 185 anti-HCV-positive patients were analyzed. Determination of the HCV genotype and subtype was performed by sequencing the 5'UTR, NS5B and core regions. According to the NS5B phylogeny, the HCV strains primarily belonged to subtypes 1b (75.2%), 2i (19.1%) and 2k (2.8%). Using a Bayesian approach, the mean date of appearance of the most recent common ancestor was estimated to be 1910 for HCV-1b and 1854 for HCV-2i. Although it is currently the most frequent genotype in Morocco and the dominant form in

hepatocellular carcinoma, it thus appears that HCV-1b was introduced into the population subsequently to HCV-2i.

**Keywords** Chronic hepatitis C · Genotype · Subtype 1b · Hepatocellular carcinoma · Morocco

Hepatitis C virus (HCV) is a leading cause of chronic liver disease, with more than 170 million people chronically infected worldwide [1]. HCV evolves very rapidly, resulting in considerable genetic diversity, and virus strains are classified into six genotypes [2], each of them further divided into multiple subtypes with uneven distribution [2]. Genotype 1b is distributed worldwide, whereas genotype 2, originating from West Africa, is common in North America, Europe, and Japan [2]. An earlier study on HCV genotypes circulating in Morocco showed genotypes 1b and 2a/2c to be predominant [3]. The global pattern of genotype distribution has been shown to change as a result of novel transmission routes and human migration [4, 5]. Previous studies have suggested a possible role of the HCV genotype in chronic hepatitis (CH) outcome and, specifically in the case of HCV type 1, which is more frequently found in advanced liver disease, such as cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC) [6]. In Morocco, no data are available about the phylogeny of circulating HCV strains and their relationship to liver disease severity. The primary aim of this study was to determine the present-day distribution of HCV subgenotypes in chronically infected Moroccan patients and to estimate the date of introduction of the most recent common ancestor (MRCA) of circulating subtypes to infer the history of the HCV epidemic. A secondary aim was to evaluate the propensity of the different HCV genotypes to be associated with primary liver cancer.

I. Brahim · A. Akil · A. E. Malki · S. Ezzikouri ·  
S. Benjelloun (✉)  
Virology Unit, Viral Hepatitis Laboratory, Pasteur Institute  
of Morocco, 1, Place Louis Pasteur, 20360 Casablanca, Morocco  
e-mail: soumaya.benjelloun@pasteur.ma

E. M. Mtairag  
Laboratoire de Physiologie et Génétique Moléculaire,  
Département de Biologie, Faculté des Sciences Ain Chock,  
Université Hassan II, Casablanca, Morocco

R. Pouillot  
Wyndale lane, Chevy Chase, USA

S. Nadir · R. Alaoui  
Service de Médecine B, CHU Ibn Rochd,  
Casablanca, Morocco

R. Njouom  
Service de Virologie, Centre Pasteur du Cameroun,  
Yaounde, Cameroon

P. Pineau  
Unité Organisation Nucléaire et Oncogénèse,  
INSERM U993, Institut Pasteur, Paris, France

This study included 185 anti-HCV-positive patients (81 males and 104 females; mean age: 64 years; range: 31–90) at the Pasteur Institute of Morocco and University Hospital Centre, Casablanca, from July 2003 to July 2010. After giving informed consent, each participant was interviewed using a questionnaire exploring demographic features as well as potential risk factors. This study was approved by the Ethics Committee of the Faculty of Medicine in Casablanca, Morocco. All patients were tested for serological markers of hepatitis B surface antigen and anti-HCV using commercial assay kits (AxSYM, Abbott Laboratories, Wiesbaden-Delkenheim, Germany) according to the manufacturer's instructions. Liver function tests including alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were done using commercially available autoanalyzers. Plasma HCV RNA was quantified by COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan, Roche Diagnostics, Germany, and the detection limit was 15 IU/ml.

HCV RNA was isolated using a QIAamp Viral Extraction Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA), and cDNA was synthesized using Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (M-MLV RT) (Invitrogen, France) according to the manufacturer's instructions. Hemi-nested PCR for the 5'UTR was used to determine HCV RNA positivity as described previously [7]. Core and NS5B regions were amplified by nested PCR using conditions described previously [8, 9]. The PCR product was purified using exonuclease I and shrimp alkaline phosphatase (GE Healthcare, USA) and bidirectionally sequenced with inner primers, using a BigDye Terminator Version 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and an ABI PRISM 3130 DNA automated sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Sequencing data were analyzed using SeqScape v2.5 software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Genetic subtyping analysis was performed using the NCBI HCV subtyping tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping/formpage.cgi>) by comparing the study sequences to a set of reference sequences using BLAST.

NS5B sequences were aligned with reference HCV sequences (Fig. 1) using CLUSTAL X v1.81 software program [10] and imported into MEGA version 5.0 software [11] to perform maximum-likelihood phylogenetic analysis using a GTR+I+G substitution model with eight categories and 500 replicates for bootstrap analysis. The Moroccan sequences reported in the current work are available in the EMBL/GenBank/DDBJ sequence databases under accession numbers HQ699733 to HQ699777 (for NS5B), JN055400 to JN055432 (for core), and HQ833218 to HQ833286 (for 5'UTR).

Statistical analysis was performed using the Statistical Package for Social Sciences program (SPSS for Windows, Rel. 15.0.1. 2006. Chicago: SPSS Inc.). Results were

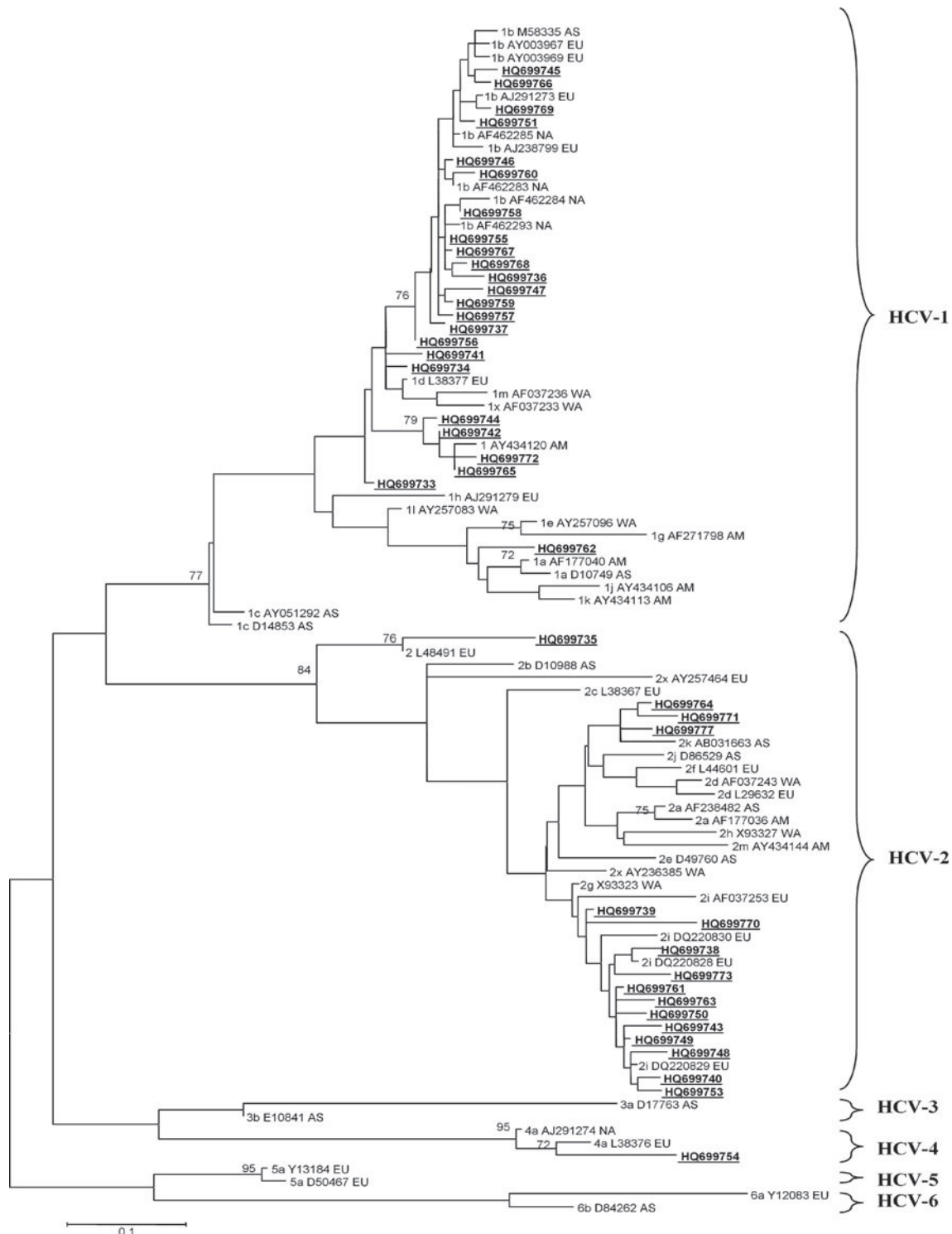
expressed as a mean, standard deviation or percentage. The chi-square and Mann-Whitney U-tests were used for data analysis. The relative risk (OR) and 95% confidence interval were calculated by univariate logistic regression analysis. All statistical tests were two-sided, and a *p*-value of less than 0.05 was used as the criterion for statistical significance. HCV demographic history was inferred using a Bayesian Monte Carlo Markov chain analysis as described elsewhere [12]. An informative normal distribution with a mean of  $5.0 \times 10^{-4}$  and a standard deviation of  $7.14 \times 10^{-5}$  was used as prior distribution.

One hundred eighty-five anti-HCV-positive (HBsAg-negative) patients were studied. HCV RNA of the 5'UTR was successfully amplified from 174 out of the 185 patients analyzed (94%). The mean virus load was significantly higher in CH than HCC ( $1.6 \times 10^6$  vs  $0.7 \times 10^6$ ,  $p = 0.018$ ). Of the 174 patients with detectable viremia, the core and NS5B regions were amplified in 152 (87.4%) and 141 (81.0%) patients, respectively.

Analysis of the 5'UTR sequences of the 174 HCV RNA(+) patients showed that 122 were genotype 1 (70.1%), 49 were genotype 2 (28.2%), and only 2 were genotype 4a (1.1%). For HCV subgenotyping, two genes were studied (core and NS5B). Based on the core region, 113 of the 152 samples were classified as HCV subtype 1b (74.3%), followed by 30 subtype 2i (19.7%), 4 subtype 2k (2.6%), and 2 subtype 4a (1.3%). Subtypes 1a and 2a were each found in only one patient (0.7%). Figure 1 shows typical maximum-likelihood phylogenetic tree obtained by analysis of the NS5B region, with groups of sequences corresponding to viral subtypes being supported by high (>70%) bootstrap values. This analysis of 141 patients allowed the HCV strains in 106 samples (75.2%) to be assigned to subgenotype 1b, followed by 27 in subtype 2i (19.1%) and 4 in subtype 2k (2.8%). Subtypes 1a, 2a, and 4a were each found in a single patient (0.7%).

In two patients (1.1%), there was a discrepancy between the subtype assignments made using the NS5B and core regions, suggesting possible recombination. Both strains were classified as genotype 2 according to the 5'UTR region and subtype 2i based on the core region. However, analysis of the NS5B region identified these strains as subtype 1b. To avoid experimental errors, amplification and sequencing were repeated, yielding the same outcome. These putative recombinants were isolated from a 60-year-old male with HCC (viral load: 711,380 IU) and a 62-year-old male with CH (viral load: 2,710,000 IU). In addition, another variant was identified as genotype 2 without subtype assignment based on the core and the NS5B regions (JN055424 and HQ699735, respectively).

To investigate the origin and spread of HCV 1b and 2i subtypes in the Moroccan population, we estimated demographic parameters in the Bayesian coalescent framework. For

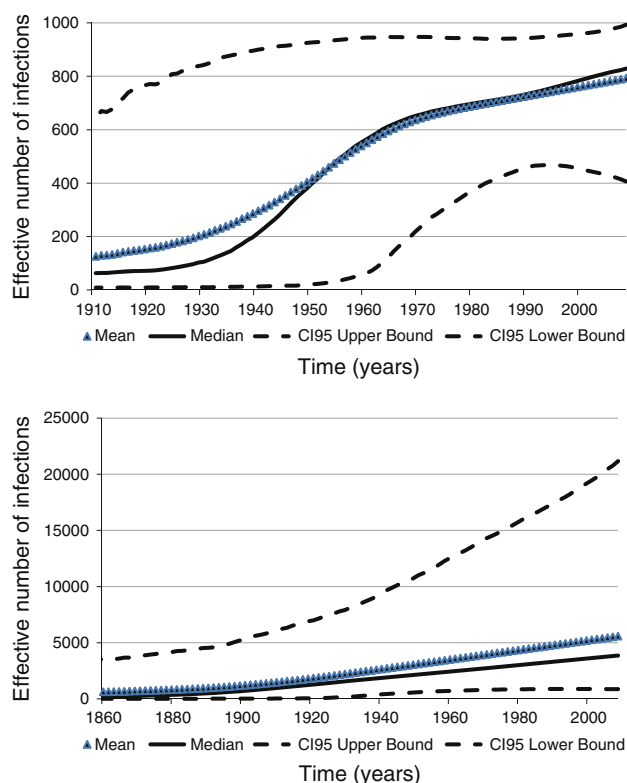


**Fig. 1** Maximum-likelihood phylogenetic tree of the NS5B region constructed using MEGA version 5.0 using a GTR+I+G substitution model with eight categories and 500 replicates for bootstrap analysis.

(EU = Europe, NA = North Africa, WA = West Africa, AM = North America, AS = Asia)

calculation of Bayesian skyline plots, each subtype was analyzed separately (Fig. 2). The inferred dates of the MRCA in the Moroccan population were 1910 (CI, 1863-1943) for HCV-1b, and 1854 (CI, 1785-1912) for HCV-2i (Fig. 2).

The mean age of patients was significantly higher in the HCC group than in the CH group ( $69 \pm 8$  vs  $58 \pm 7$  years,  $p = 0.0001$ ). The male/female ratio increased from the CH to the HCC group, with a predominance of males in this



**Fig. 2** Bayesian skyline plots estimated for strains of HCV-1b (top) and HCV-2i (bottom)

group ( $p = 0.002$ ). There was a significant difference in viral load between the CH and HCC groups ( $p = 0.018$ ). The prevalence of AST was significantly higher in the HCC group than in the CH group ( $p = 0.033$ ). The genotype distribution was different in the HCC and CH groups. The subtype 1b prevalence was found to increase with the severity of liver disease (67.5% in CH and 84.4% in HCC;  $p = 0.031$ , Table 1). The relative risk for developing HCC in patients with subtype 1b was 2.6% (95% IC; 1.15–5.85) after adjustment for age, gender and other subtype of HCV.

Genotyping of HCV is routinely performed for two reasons. The first involves clinical decision making, i.e., to make recommendations and provide counselling regarding treatment. The second regards phylogeny and epidemiology, i.e., the monitoring of viral strain distribution and identification of common sources of transmission. For this latter purpose, accurate subtype determination is necessary. Our study investigates the genetic variability of HCV infection in Morocco, a country with an intermediate endemicity of HCV infection (1.1% of the general population) [13]. We set out to gather present-day data on the predominant genotypes in order to determine if genotype distribution has changed since the 1990s and to determine the MRCA of major circulating subtypes. Additional objectives were to determine whether there is any association of genotype with age, gender and severity of liver

**Table 1** Clinical data and HCV genotype prevalence in Moroccan patients of different clinical status based on the NS5B region

|                            | CH <sup>†</sup><br>(n = 77) | HCC <sup>‡</sup><br>(n = 64) | P-value |
|----------------------------|-----------------------------|------------------------------|---------|
| Mean age $\pm$ SD, (range) | 58 $\pm$ 7 (39–71)          | 69 $\pm$ 8 (50–80)           | 0.0001  |
| Gender (%)                 |                             |                              |         |
| Male                       | 27 (35)                     | 39 (61)                      | 0.002   |
| Female                     | 50 (65)                     | 25 (39)                      |         |
| Mean ALT* (IU/L)           | 69 $\pm$ 36                 | 87 $\pm$ 56                  | 0.356   |
| Mean AST** (IU/L)          | 63 $\pm$ 40                 | 89 $\pm$ 54                  | 0.033   |
| Median viral load (IU/ml)  | 1600000                     | 776690                       | 0.018   |
| Subtype (%)                |                             |                              |         |
| Subtype 1a                 | 0 (0.0)                     | 1 (1.6)                      | 0.454   |
| Subtype 1b                 | 52 (67.5)                   | 54 (84.4)                    | 0.031   |
| Subtype 2a                 | 1 (1.3)                     | 0 (0.0)                      | 0.546   |
| Subtype 2i                 | 18 (23.4)                   | 9 (14.1)                     | 0.127   |
| Subtype 2k                 | 4 (5.2)                     | 0 (0.0)                      | 0.126   |
| Subtype 4a                 | 1 (1.3)                     | 0 (0.0)                      | 0.546   |
| Unclassified               | 1 (1.3)                     | 0 (0.0)                      | 0.546   |

<sup>†</sup> CH; chronic hepatitis

<sup>‡</sup> HCC; hepatocellular carcinoma

\* Alanine aminotransferase, normal values: 7–56 IU/L

\*\* Aspartate aminotransferase, normal values: 5–35 IU/L

disease. In Morocco, the earliest study, performed in 1997, found that the predominant genotype was 1b (47.6%), followed by 2a/2c (37.1%) and 1a (2.8%). These determinations, however, were made using the line probe assay (Inno-LiPA) [3], which is not versatile enough to determine HCV subtypes accurately within genotypes 2 and 4 due to their high diversity [14]. In the present study, the choice of the NS5B region for phylogenetic analysis provided valuable reference information on the genetic heterogeneity within the prevalent subtypes [15]. Our findings confirm previous data showing that subtype 1b is the most common in Morocco (47.6%) [3]. However, it appears that its prevalence has increased massively since the first report ( $p < 10^{-4}$ ).

Large-scale medical intervention is presumably responsible of the worldwide dissemination of subtype 1b [16]. Moroccan sequences from genotype 1b displayed the highest nucleotide identity to those of Maghrebian and European isolates [17–19]. Such resemblance is in keeping with the close links between Morocco and European countries, especially France, Spain and the Netherlands.

In the present report, HCV genotype 2 represents 22.6% of isolated strains, indicating a decline in comparison to data from the 1990s (37.1%,  $p = 0.02$ ) [3]. Subtype 2i was the most prevalent in our study (19.1%). This situation is



reminiscent of what is observed in southwestern France, where genotype 2i was found in patients of North African origin [19]. In contrast, to Egypt (91%) and the Middle Eastern states (38–48%) but similarly to what has been reported in Tunisia (1%), our results indicate a low circulation of genotype 4 in Morocco (1.1%) [17, 20]. The two Moroccan 4a isolates displayed a strong genetic similarity to Egyptian isolates.

A coalescent approach to population genetics was used to estimate the epidemic history of HCV-1b and HCV-2i strains. This method was used successfully to reconstruct the history of HCV infection before its identification in 1989 [12, 21]. Our findings suggest that HCV-2i appeared in Morocco during the 19th century (MRCA: 1854 [CI, 1785–1912]), whereas HCV-1b seems to have been introduced at the beginning of the 20th century (MRCA: 1910 [CI, 1863–1943]). Because the sequences were sampled over a short period of time, they contained insufficient information to co-estimate their evolutionary rate accurately. We note the absence of major phases of expansion, and a constant increase in efficient infections is still continuing at present.

A possible intergenotypic recombination event between the most frequent genotypes (1b, 2i) was suggested by the comparison of NS5B and core regions in two samples. Since recombination seems to be a rare event in HCV, further sequence analysis on the full-length genome is needed to prove that recombination events had occurred [22].

Previous reports showed that patients infected with genotypes 1b or 2 were older on average than patients infected with genotypes 1a or 3a [18]. In Morocco, the analysis of genotype distribution according to age indicates that patients infected with type 1 ( $64 \pm 9$  years) are not significantly different than patients infected with non-1 genotypes ( $63 \pm 10$  years;  $p = 0.841$ ). When genotype distribution was analysed with regard to the stage of liver disease (CH versus HCC), it was found that subtype 1b prevalence increased with the severity of liver disease (67.5% in CH, and 84.4% in HCC) ( $p = 0.031$ ). Several case-control and cohort studies on HCC and liver cirrhosis (LC) patients in Europe and Asia found a weak, albeit consistent, increase in the relative risk of severe liver disease with HCV subtype 1b [6, 23]. However, other studies did not confirm these findings [24, 25]. The association of HCV genotype and pathogenesis of liver disease, particularly HCC, is therefore still debatable and needs prospective cohort studies to obtain more conclusive data.

In conclusion, our findings underline again the strong epidemiological link between Morocco and Europe, especially for genotype 1b, the most frequent HCV genotype in Moroccan patients. The prevalence of this subtype increased with the severity of liver disease, as in HCC

cases. Further investigations including full-length genome analysis are needed to determine whether a subset of molecular variants within HCV subtype 1b is endowed with a greater protumorigenic activity. In addition, we provide novel evidence coming from a hitherto poorly studied region suggesting that HCV subtype 1b itself is endowed with a stronger protumorigenic activity than other genotypes. It is plausible that conspicuous discrepancies noticed in the literature with regard to this issue merely reflect the presence or absence of confusion factors to be found among concomitant etiological agents (alcohol abuse, especially). Finally, a coalescent approach to population genetics has allowed it to be estimated that HCV-2i appeared during the 19th century, coming ahead of HCV-1b in the recent medical history of Morocco.

**Acknowledgments** The authors would like to acknowledge all patients for their participation in this study. We thank Dr. Flor H. Pujol for her help. This work was supported by Pasteur Institute of Morocco.

**Conflict of interest** No conflict of interest.

## References

1. Organisation WH (1999) Hepatitis C global prevalence. *Wkly Epidemiol Rec* 74:425–427
2. Kuiken C, Simmonds P (2009) Nomenclature and numbering of the hepatitis C virus. *Methods Mol Biol* 510:33–53
3. Benani A, El-Turk J, Benjelloun S, Sekkat S, Nadifi S et al (1997) HCV genotypes in Morocco. *J Med Virol* 52:396–398
4. Zein NN (2000) Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *Clin Microbiol Rev* 13:223–235
5. Hoofnagle JH (2002) Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology* 36:S21–S29
6. Silini E, Bottelli R, Asti M, Bruno S, Candusso ME et al (1996) Hepatitis C virus genotypes and risk of hepatocellular carcinoma in cirrhosis: a case-control study. *Gastroenterology* 111:199–205
7. Li JS, Tong SP, Vitvitski L, Trepo C (1995) Single-step nested polymerase chain reaction for detection of different genotypes of hepatitis C virus. *J Med Virol* 45:151–155
8. Utama A, Tania NP, Dhenni R, Gani RA, Hasan I et al (2010) Genotype diversity of hepatitis C virus (HCV) in HCV-associated liver disease patients in Indonesia. *Liver Int* 30:1152–1160
9. Noppornpanth S, Lien TX, Poovorawan Y, Smits SL, Osterhaus AD et al (2006) Identification of a naturally occurring recombinant genotype 2/6 hepatitis C virus. *J Virol* 80:7569–7577
10. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25:4876–4882
11. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M et al (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28:2731–2739
12. Njouom R, Frost E, Deslandes S, Mamadou-Yaya F, Labbe AC et al (2009) Predominance of hepatitis C virus genotype 4 infection and rapid transmission between 1935 and 1965 in the Central African Republic. *J Gen Virol* 90:2452–2456

13. Benjelloun S, Bahbouhi B, Sekkat S, Bennani A, Hda N et al (1996) Anti-HCV seroprevalence and risk factors of hepatitis C virus infection in Moroccan population groups. *Res Virol* 147: 247–255
14. Simmonds P, Mellor J, Sakuldamrongpanich T, Nuchaprayoon C, Tanprasert S et al (1996) Evolutionary analysis of variants of hepatitis C virus found in South-East Asia: comparison with classifications based upon sequence similarity. *J Gen Virol* 77(Pt 12):3013–3024
15. Murphy DG, Willems B, Deschênes M, Hilzenrat N, Mousseau R et al (2007) Use of sequence analysis of the NS5B region for routine genotyping of hepatitis C virus with reference to C/E1 and 5' untranslated region sequences. *J Clin Microbiol* 45: 1102–1112
16. Smith DB, Pathirana S, Davidson F, Lawlor E, Power J et al (1997) The origin of hepatitis C virus genotypes. *J Gen Virol* 78(Pt 2):321–328
17. Djebbi A, Mejri S, Thiers V, Triki H (2004) Phylogenetic analysis of hepatitis C virus isolates from Tunisian patients. *Eur J Epidemiol* 19:555–562
18. Cantaloube JF, Gallian P, Attoui H, Biagini P, De Micco P et al (2005) Genotype distribution and molecular epidemiology of hepatitis C virus in blood donors from southeast France. *J Clin Microbiol* 43:3624–3629
19. Thomas F, Nicot F, Sandres-Saune K, Dubois M, Legrand-Abravanel F et al (2007) Genetic diversity of HCV genotype 2 strains in south western France. *J Med Virol* 79:26–34
20. Ramia S, Eid-Fares J (2006) Distribution of hepatitis C virus genotypes in the Middle East. *Int J Infect Dis* 10:272–277
21. Verbeeck J, Maes P, Lemey P, Pybus OG, Wollants E et al (2006) Investigating the origin and spread of hepatitis C virus genotype 5a. *J Virol* 80:4220–4226
22. Legrand-Abravanel F, Claudinon J, Nicot F, Dubois M, Chapuy-Regaud S et al (2007) New natural intergenotypic (2/5) recombinant of hepatitis C virus. *J Virol* 81:4357–4362
23. Ikeda K, Kobayashi M, Someya T, Saitoh S, Tsubota A et al (2002) Influence of hepatitis C virus subtype on hepatocellular carcinogenesis: a multivariate analysis of a retrospective cohort of 593 patients with cirrhosis. *Intervirology* 45:71–78
24. Benvegnu L, Pontisso P, Cavalletto D, Noventa F, Chemello L et al (1997) Lack of correlation between hepatitis C virus genotypes and clinical course of hepatitis C virus-related cirrhosis. *Hepatology* 25:211–215
25. Takano S, Yokosuka O, Imazeki F, Tagawa M, Omata M (1995) Incidence of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B and C: a prospective study of 251 patients. *Hepatology* 21:650–655

# Insertion/deletion polymorphisms are convenient and reliable markers to assess chromosomal instability in human tumors

Agnès Marchio<sup>1</sup>, Abdellah Akil<sup>2</sup>, Benoît Terris<sup>3</sup>, Anne Dejean<sup>1</sup>, Pascal Pineau<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unité "Organisation Nucléaire et Oncogénèse", INSERM U993, Institut Pasteur, Paris - France

<sup>2</sup>Laboratoires des Hépatites Virales, Institut Pasteur du Maroc, Casablanca - Morocco

<sup>3</sup>Laboratoire d'Anatomie Pathologique, Hôpital Cochin, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris - France

## ABSTRACT

Chromosomal instability (CIN) is frequently associated with a poor outcome in human carcinomas. The genomes of the main human malignancies are well defined as hundreds of tumors have been characterized by arrays. Targeting the appropriate chromosomes with set of markers appears as a realistic approach for CIN assessment. We decided to test the reliability of different insertion/deletion (InDel) polymorphisms to detect allelic loss in a subset of previously characterized hepatocellular carcinomas (HCC). To this aim 3 kinds of markers, L1 insertion (n=1), Alu insertions (n=4) and Marshfield InDel (MID, n=8) markers, were tested on a series of 68 paired HCC/non-tumor liver samples that were previously characterized for loss of heterozygosity (LOH). All markers were analyzed on agarose gels and some were tested with the high resolution melting (HRM) technique. Heterozygosity of the tested markers was high with a mean of 0.489 and a range of 0.265-0.525. Using 6 markers for chromosome 8p, the sensitivity of the method was high. LOH was detected in all samples known to be affected (n=34) whereas retention was found in 29/30 samples (specificity of 96.6%). Finally, the HRM analysis applied to 2 MID markers provided consistent profiles enabling closed-tube determination of chromosomes 17p and 18q status. Overall, our work suggests that different types of InDel markers are suitable for CIN detection in human tumors and may provide convenient and useful information for basic or translational research as well as for future applications in clinical practice.

**Key word:** Insertion/deletion, Markers, Alu-insertion, Loss of heterozygosity, Instability, Tumor

Received: January 11, 2012; Accepted: March 29, 2012

## INTRODUCTION

Chromosomal instability (CIN) represents a important hallmark of solid tumors (1). CIN, defined as a high rate of chromosomal copy number changes in a given tumor, is either the result of allelic losses or allelic gains (2). In medical practice, CIN is known to be commonly associated with poor prognosis and resistance to chemotherapy (3, 4). Major efforts have been made recently to identify compounds targeting unstable tumors; promising, but rather preliminary, results have now been published (5). Hopefully, in the near future, new drugs capable of reducing CIN<sup>+</sup> tumors will be introduced in therapeutics (6).

Techniques enabling CIN detection in tumors have greatly evolved during the last 2 decades from restriction fragment length polymorphisms (RFLP) to single nucleotide polymorphism (SNP) arrays through microsatellite analysis, comparative genomic hybridization (CGH) or CGH array (7-11). Older procedures, such as the RFLP, were consuming large amounts of clinical samples and were characterized by a low throughput. Moreover, the protocols formerly applied to allelotyping were

frequently using radioactive techniques, which are approaches that tend to be discarded in the present-day practices. Alternative fluorescent techniques were also developed, but their appropriate use requires high technological standards and heavy financial investments. Novel procedures using microarrays clearly offer the major advantage of exhaustively exploring chromosomal copy number changes in tumors. However they remain very expensive especially in a period in which financial resources are limited and cancer patients are more numerous than ever. The heavy costs of array-based techniques, affordable only by a limited number of well-funded genome centers, tend to restrict the research on chromosomal changes in cancer to a small number of affluent countries (12-15). This implies that the study of tumor development in less favored or developing countries will be performed in a remote future or can be analyzed only abroad. Such situation is not ideal especially when considering that the study of the large molecular heterogeneity of a given cancer type requires its analysis in different ethno-geographic and environmental contexts. Furthermore, copy number alterations usually involve entire chromosomal arms and the definition of



CIN<sup>+</sup> tumors does not need the identification of small interstitial deletions. In addition, it is commonly assumed that the degree of CIN in a given tumor can be scored through a limited set of target chromosomes, without the need of thorough exploration of the whole tumor genome (16-18). Finally, chromosomes recurrently associated with tumor prognosis are now defined rather clearly in different tumor types. As an example, 846 hepatocellular carcinoma (HCC) samples have been fully characterized and corresponding data are available on the Progenetix database (<http://www.progenetix.net>). Chromosomes 5q, 6q, 9p, 17p or 21q copy number changes are considered as major prognostic markers in European patients with HCC (19-21).

Polymorphisms generated by insertions and/or deletions (InDel) are abundant in the human genome. One of the major sources for such polymorphisms are Alu or LINE retroelements insertions (22). Such insertions are commonly used to trace ancestry and admixture in human populations. Furthermore, some of these retroelements are still very active and involved in a large variety of pathogenic processes, including cancer (23, 24). A second class of more diverse and smaller InDels can be found in the human genome and can extend from 1 to 50 bp (25-27). Taken together both these subtypes can be included in the category of diallelic markers, which also comprises single nucleotide polymorphisms. Despite being very convenient for analysis, InDels are currently not commonly used in medical research, as demonstrated by the fact that a thorough PubMed search did not retrieve any records of their use as a diagnostic tool. In principle both classes of InDel are easy to distinguish on agarose gels, and could thus be used to detect loss of heterozygosity (LOH) by comparing tumor DNA with a matched non-tumor DNA sample. Finally, some of these polymorphisms can be investigated by the technique of high resolution melting (HRM). The HRM uses the re-annealing kinetics related to DNA fragment composition or size differences in order to distinguish the presence of 1 or 2 different molecules in the same PCR reaction (28, 29).

To assess the usefulness of InDel markers for allelic loss detection in human cancer samples, we have explored a series of HCC samples, previously analyzed by microsatellite analysis and CGH, with a set of InDel markers mapping on chromosomes 8p, 9p, 10q, 17p, 18q. Our preliminary work indicates that InDel markers yielded results highly correlated with those previously obtained by microsatellites or CGH techniques. In addition, we suggest that some of the more versatile InDel markers may be analyzed with HRM, paving the way not only for future inexpensive and high-throughput investigations but also for their potential use in clinical practice.

## PATIENTS AND METHODS

### *Human tumor samples*

All samples were chosen from a retrospective cohort of HCCs, which has been used in previously published studies (30-32). The recruitment of patients occurred in respect of the declaration of Helsinki. An institutional review board approved the research here presented (RBM n°2005-019). DNA samples were extracted by the classical phenol/chloroform method. In brief, immediately after surgical resection, tumor and non-tumor liver tissues were snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. Genomic DNA isolation resulted from proteinase K digestion followed by 2 phenol extraction and 1 chloroform extraction. DNA was then precipitated with ethanol and resuspended in TE buffer (31).

A series of 68 HCCs, previously analyzed by microsatellite for chromosome 8p, was chosen. Status of chromosomes 9p, 10q, 17p and 18q was also known for some of these samples. Among the 68 samples, a subset of 6 tumors were previously analyzed also by CGH (32).

### *Choice of insertion/deletion markers*

InDel markers were chosen from 3 different databases: dbRIP, a database for retroelements insertion polymorphisms in humans, (<http://falcon.roswellpark.org:9090/searchRIP.html>); PRED, a database for polymorphic retroelements; and MID polymorphisms (<http://www.marshfieldclinic.org/mgs/>). Four polymorphic Alu and one L1 line insertions mapping on chromosome 8p were chosen from the dbRIP website, whereas 8 small InDels mapping in 8p (n=4), 9p (n=1), 10q (n=1), 17p (n=1) and 18q (n=1) were selected from the Marshfield genetics website. Primer sequences enabling markers amplification by PCR are provided in Table I.

### *Electrophoretic analysis*

Polymorphic insertions of retroelements were analyzed on standard 2% agarose gels (Life technologies, Villebon, France) in 0.5X TBE buffer. MID were investigated on a 4% <1000 bp agarose gel (Interchim, Montluçon, France) in 1X TBE buffer. Minimal allelic size differences for Marshfield markers were limited to 10 bp in order to get a sufficient resolution on agarose gel. LOH was scored after validation by 2 independent scientists (AA, AM or PP).

### *HRM curve analysis*

Genomic DNA was quantified with a spectrophotometer (Nanodrop 1000, Thermo Scientific).

The final reaction mixture, prepared in a volume of 10  $\mu$ L contained 50 ng of genomic DNA, 5  $\mu$ L of the SsoFast™ EvaGreen® supermix (Bio-rad, Mississauga, Ontario, Canada) and 5 pmol of each of the primers. All reactions were performed in duplicates using 96-well Hard-Shell PCR plates (Bio-Rad) and sealed with Microseal 'B' film (Bio-Rad). Real-time PCR and HRM analysis were carried out in a CFX real-time PCR detection system (Bio-Rad). The amplification conditions were as follows: initial 98°C for 2 minutes, then 35 cycles at 95°C for 5 seconds and 60°C for 20 seconds. PCR products were subsequently heated for 1 minute at 95°C and cooled to 50°C for 1 minute. The melting curve was generated by measuring the fluorescence during a temperature increase from 60°C to 90°C (with increments of 0.2°C/10sec). Results were analyzed with Bio-Rad CFX Manager software V2.0 and then with Bio-Rad Precision Melt Analysis software V1.0 according to the procedure previously described (33, 34). Normalized melting curves were obtained by adjusting the pre and post melting regions, the shape sensitivity (between 17 and 50) and the T<sub>m</sub> difference threshold (0.15) to attain the best clustering. To allow comparison and differentiation between the genotypes, curve differences were magnified by subtracting each curve from

the heterozygous genotype. Prior to using the Precision Melt Analysis software, all the differences observed in the melting profiles were considered significant if the amplification reactions occurred before the quantification cycle 30 and if the samples showed an equal plateau of fluorescence (33, 34).

## RESULTS

### *Polymorphic nature of the InDel markers*

A series of 13 diallelic InDel markers was assessed for suitability in LOH analysis. Five of them were resulting from retroposons insertions belonging to the long interspersed nuclear element (L1HS77) or to the short interspersed nuclear element (Alu insertions: TPA25, Yc1NBC69, Yc1RG60 and Yb8NBC636). The remaining markers were small InDels characterized by Marshfield genetics.

The purpose of our research was to apply InDel markers to allelic loss detection in human HCC. Nine of the markers were selected because they were mapping on chromosome 8p, the major target of allelic losses in

**TABLE I - DIALLELIC MAKERS USED IN THE PRESENT STUDY**

| Marker        | Primer Sequences                                            | Alleles Size (bp) | Difference (bp) | PCR          |
|---------------|-------------------------------------------------------------|-------------------|-----------------|--------------|
| L1HS77        | p TTCCTAAATGGCCTTACTATCCTTT<br>j TCAGAAGTGCTAACAACCTAGTAGGA | 78-990            | 912             | 52SD         |
| MID274b       | p CGCTGTCCCTGGCTGCAATG<br>j ACAGAAGCTGATTTTGGTTG            | 110-120           | 10              | 52SD         |
| MID1098b      | p GCATCTAGCACTGGGCCTGG<br>j TTAAGTGGTCTGTGCTCTTG            | 85-95             | 10              | 52SD         |
| MID1218       | p TAAGTTGGGTTGTCTTTTGC<br>j AACAGAGAATAAACTGGGGA            | 128-138           | 10              | 50dir        |
| MID2976       | p ACAGAATGTTTTCTTGACAC<br>j GGTAAGTAGAAGGGGGTGAG            | 125-139           | 14              | 52SD         |
| MID2989       | p ACAATGGATCCGAAGAAAT<br>j AGGAATTTCAAGCAGGAATT             | 110-122           | 12              | 50dir        |
| MID3026       | p GGGTCATACTTCCAGGACTT<br>j TTTCTGAATTCAAATGGAATG           | 96-114            | 18              | 52SD         |
| MID3044       | p TTAGAAGACCACCAAGACCA<br>j TCCTAATCAATGATGCCTGT            | 115-128           | 15              | 52SD         |
| MID3084b      | p ATGCCAACTACAGCTGCCAC<br>j TTGCCCGTGGTGAGGGATAC            | 90-100            | 10              | 52SD         |
| TPA25         | p GTAAGAGTTCGTAACAGGACAGCT<br>j CCCACCTAGGAGAATTCTCTTT      | 113-424           | 311             | 50SD+DMSO 7% |
| Yb8NBC636     | p CCTCTGGCAAGCTGCTTAAT<br>j TCACAGCTAGAGGAGACATGAAA         | 169-498           | 317             | 52SD         |
| Yc1NBC69 1815 | p CCCACATTTATCAGTACCTACA<br>j CCTTGCAGAATAGCAATGAT          | 210-524           | 314             | 52SD         |
| Yc1RG60       | p TCCACATTTCACTGTGAATTT<br>j GGCATTTGGGATAGTTCCTG           | 216-551           | 335             | 52SD         |

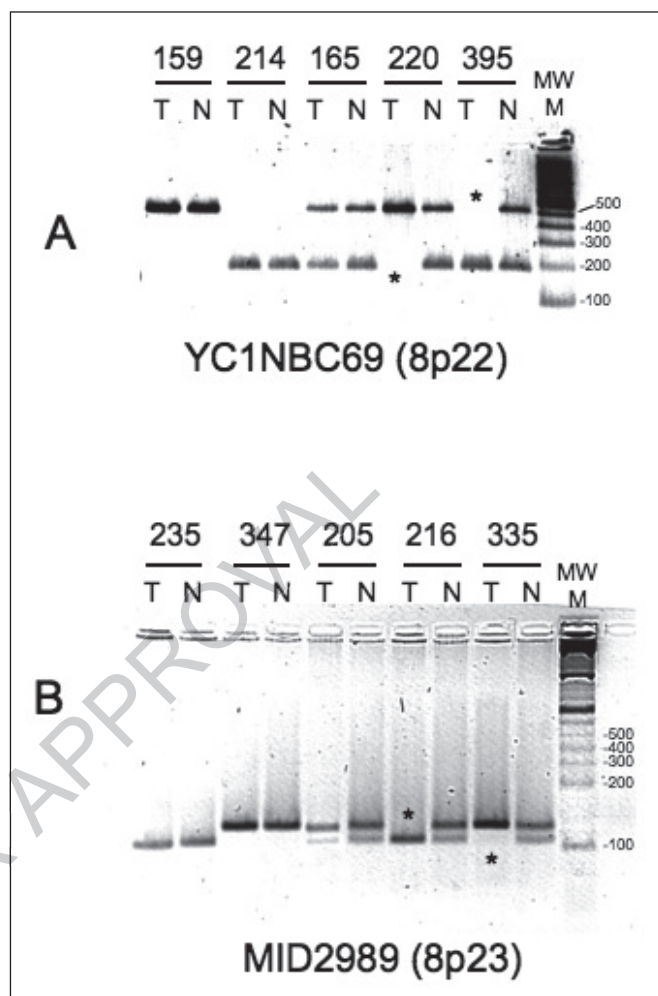
b: indicates that the primers are different from those available on websites. SD indicates a step-down protocol of amplification with 50 or 52°C as the lowest temperature of annealing

liver cancer. Four additional Marshfield markers, mapping on chromosomal arms commonly deleted in HCC (9p, 10q, 17p, 18q), were chosen for their reduced allelic size difference (10 bp), a configuration making them suitable both for agarose gel electrophoresis and HRM analysis.

All markers were tested on non-tumor DNA from 68 European patients with HCC. Two markers mapping on chromosome 8p were found to be unsuitable for LOH assay. The Alu insertion Yc1RG60 (8p22) was found to be essentially monomorphic with only 4 heterozygous patients out of 69 (5.9%) whereas MID2976 was found to be always dimorphic indicating that PCR primers were probably targeting several loci in the human genome. The remaining set of InDel markers (11/13, 84.6%) was conforming to the requirements of LOH assay with high rates of heterozygosity (mean of 0.489; range of 0.265-0.525) with regard to diallelic markers standards. Overall, if we removed from the analysis Yc1RG60 and MID2976, the measured rates of heterozygosity in European HCC patients were consistent with the values previously published on websites (Tab. II). Sixty-four samples out of 68 (94.1%) were displaying at least 1 heterozygous marker on chromosome 8p. Interestingly, a subset of 54 samples (84%) was heterozygous at 2 loci thus enabling the assessment of chromosomal status with more confidence.

#### *LOH assay produced by InDel markers correlates with previous results obtained by other techniques*

Chromosome 8p is one of the main targets for allelic deletion in HCC. To assess the ability of InDel markers to detect LOH, we decided to test the 7 markers mapping in 8p on the series of 64 tumor/non-tumor DNA paired samples displaying at least 1 heterozygous diallelic marker in the set of seven 8p markers suitable for LOH assay. All samples have been previously analyzed for chromosome 8p status. Among the 64 HCC samples, 34 were known to



**Fig. 1** - Electrophoresis with different outcomes for LOH assay performed with InDel polymorphisms at 2 loci of chromosome 8p. T indicates the tumor and N the non-tumor DNA samples from 5 patients. Absent or strongly diminished alleles were scored as LOH+ and are indicated by an asterisk. MWM, molecular weight marker.

**TABLE II** - DIALLELIC MARKERS TESTED IN THE PRESENT STUDY

| InDel Markers | Cytoband | Draft (in Mb) | n Patients tested | Published Heterozygosity | Measured Heterozygosity | Commentary                                       |
|---------------|----------|---------------|-------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------------------------------|
| TPA25*        | 8p11.2   | 42.03         | 68                | 0.456                    | 0.375                   |                                                  |
| MID3026       | 8p12     | 35.12         | 68                | ND                       | 0.417                   |                                                  |
| MID3044       | 8p21.3   | 21.27         | 68                | ND                       | 0.358                   |                                                  |
| L1HS77        | 8p22     | 17.45         | 68                | 0.097                    | 0.525                   | allelic size difference unsuitable for LOH assay |
| Yc1NBC69      | 8p22     | 17.00         | 68                | 0.443                    | 0.470                   |                                                  |
| Yc1RG60       | 8p22     | 15.09         | 68                | 0.273                    | 0.055                   | monomorphic                                      |
| MID2989       | 8p23     | 6.79          | 68                | ND                       | 0.307                   |                                                  |
| MID2976       | 8p23     | 6.29          | 68                | ND                       | 1.000                   | always dimorphic, at least two loci              |
| Yb8NBC636     | 8p23     | 5.73          | 68                | 0.444                    | 0.500                   |                                                  |
| MID1218       | 9p13.3   | 33.99         | 68                | 0.45                     | 0.514                   |                                                  |
| MID1098b      | 10q22.3  | 78.85         | 68                | 0.43                     | 0.510                   |                                                  |
| MID274b       | 17p11.2  | 20.02         | 68                | 0.48                     | 0.405                   |                                                  |
| MID3084b      | 18q11.2  | 19.846        | 68                | ND                       | 0.265                   |                                                  |

Three of the markers (L1HS77, Yc1RG60, MID2976) were discarded as unsuitable for LOH assay. ND, Not determined. \*[http://alfred.med.yale.edu/alfred/recordinfo.asp?condition=sites.site\\_uid=%27SI0001521](http://alfred.med.yale.edu/alfred/recordinfo.asp?condition=sites.site_uid=%27SI0001521)



have lost 1 chromosome 8p allele while 30 had retention of these chromosomal segments. The large insertions (Alu and L1) were tested on a 2% standard agarose gel (Fig. 1A), whereas small InDels were analyzed on a 4% high-resolution agarose gel (Fig. 1B).

LOH interpretation was simple, as the resulting gel was not blurred by the presence of mirror/stutter bands commonly observed in dinucleotide microsatellite analysis. Overall, with regard to the LOH outcome, the correlation between microsatellite and InDel markers analyses was remarkable. The sensitivity of our test was high: all 34 samples (100%) that were previously scored LOH<sup>+</sup> were confirmed with InDel markers analysis. Among the 30 samples with 8p retention (according to microsatellite analysis) 29 (96.7%) did not display any loss in our InDel analysis. The specificity of InDel markers was thus high. The precision rate (or positive predictive value) of InDel markers was therefore of 97%. A single sample (106CHC) displayed a previously undetected allelic loss in 8p23. The deleted marker (Yb8NBC636) was located within the CUB and Sushi multiple domains 1 (CSMD1), a large gene mapping in a fragile region of the human genome (35, 36). It is thus plausible that 106CHC has a true loss in 8p23. Also, there was a good correlation between our findings and the previous CGH analysis (Tab. III). However, these encouraging results were obtained only after the exclusion of 1 InDel marker. In fact, interpretation of the LOH assay was almost impossible for L1HS77 and therefore this marker was not included in the analysis. Allelic size difference for the LINE L1HS77 polymorphism (912bp) is conferring an important amplification advantage to the smaller allele thus reducing the process of amplification of the large allele. This condition introduces a bias that prevents any correct interpretation of allelic imbalances in tumor samples (data not shown).

#### *HRM curve analysis*

To assess the ability of the HRM curve analysis to detect the chromosomal status previously characterized by LOH/InDel markers, we studied 4 MID markers: MID274b, MID1218, MID1098b, MID3084. Smaller markers, MID1098b and MID3084 ( $\leq 100$  bp in size), were suitable for HRM analysis and gave consistent HRM profiles. Amplimers above the size of 100 bp (MID274b and MID1218) did not yield interpretable data, possibly due to their large size. Eleven tumor/non-tumor DNA paired samples were chosen to assess different allelic status (e.g. homozygotes and heterozygotes, Fig. 2).

After amplification and melting curve analysis (see "Materials and Methods"), 3 distinct melting profiles were observed. Each profile brought together samples showing identical electrophoretic patterns on agarose gels (Fig. 2). The lack of extra clusters likely indicates that, apart from the known InDel polymorphism, the remaining part

of the target sequence is monomorphic. The sensibility of the HRM analysis can be appreciated in sample 1 for the MID1098b. In this case, the LOH profile observed on gel migration of the tumorous part (T) shows a remaining small upper band compared to its non-tumorous counterpart (NT). Albeit in HRM analysis it clusters with the homozygote samples, its HRM profile occupies an intermediate position between homo- and heterozygote profiles, suggesting the residual presence of the deleted allele in a subset of tumor cells or in non-tumor infiltrating cells such as lymphocytes, fibroblasts or endothelial cells (Fig. 2). Thus, HRM analysis is appropriate for the detection of LOH at InDel markers, provided it is performed on appropriate amplimers.

## DISCUSSION

In contrast with leukemia or soft-tissues sarcomas, which are mostly affected by chromosomal rearrangements, the genome of carcinomas is essentially altered by chromosomal copy number changes (37). As shown by allelotyping or CGH studies, these changes (either losses or gains) usually affect a whole chromosome or entire chromosomal arms through terminal deletions or isochromosomes formation. In most tumors, small interstitial deletions are thus more an exception than a rule. These copy number variations are mostly non-random and usually, for a given tumor type, affect a set of well-defined chromosomes. In HCC, for example, recurrent losses occur at chromosomes 1p, 4q, 8p, 9p, 13q, 16q and 17p, whereas gains are commonly observed on chromosomes 1q, 6p, 8q and 17p (32, 38, 39). The extent of this phenomenon varies depending on the tissular origin of the neoplasia; however, within a tumor type individual samples can be assigned to either a chromosomally unstable subclass (CIN<sup>+</sup>) or a stable subclass (CIN<sup>-</sup>). Such genomic dichotomy enables researchers to discriminate tumors that are usually less differentiated, more aggressive and more chemoresistant (CIN<sup>+</sup>) from the others. However, as karyotyping of carcinomas is not possible in routine practice and as microarray techniques remain expensive, CIN definition still remains excluded from the clinical practice.

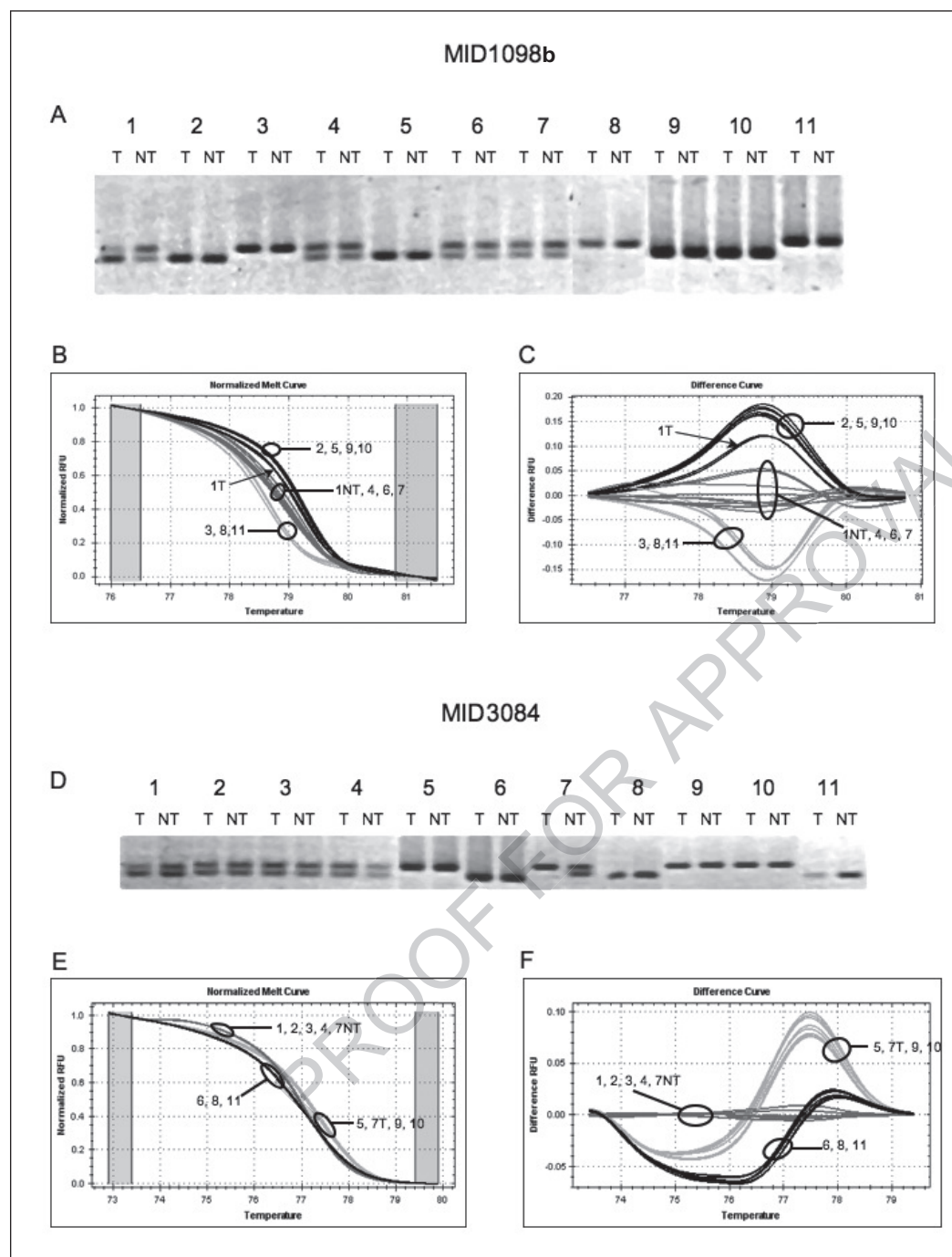
In the present work we suggest that the definition of CIN is possible simply by the use of InDel markers. These diallelic markers can be analyzed in most laboratories with standard techniques of PCR and electrophoresis. Our comparison of the data obtained by microsatellite analysis and InDel analysis indicates an almost perfect overlap between both sets of results. A discrepancy was found in 1 single sample (106CHC) out of the 68 studied. In that tumor sample, originally classified in the 8p retention group, the genome segment analyzed was possibly not entirely intact. The deleted marker (Yb8NBC636) maps

**TABLE III** - ANALYSIS OF 64 HCC SAMPLES WITH 6 INDEL MARKER MAPPING ON CHROMOSOME 8P.

| Tumors ID | Microsatellite<br>8p | CGH<br>8p | TPA25<br>8p11.2 | MID3026<br>8p12 | MID3044<br>8p21 | Yc1NBC69<br>8p22 | MID2989<br>8p23 | Yb8NBC636<br>8p23 |
|-----------|----------------------|-----------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|-------------------|
| 118CHC    | LOH8p+               |           | /               | LOH             | /               | LOH              | /               | LOH               |
| 130CHC    | LOH8p+               |           | /               | /               | /               | /                | LOH             | /                 |
| 173CHC    | LOH8p+               |           | /               | LOH             | LOH             | /                | /               | /                 |
| 195CHC    | LOH8p+               |           | LOH             | /               | /               | /                | /               | LOH               |
| 196CHC    | LOH8p+               |           | /               | /               | /               | LOH              | /               | /                 |
| 209CHC    | LOH8p+               |           | /               | LOH             | /               | LOH              | /               | LOH               |
| 214CHC    | LOH8p+               |           | /               | LOH             | /               | /                | LOH             | LOH               |
| 216CHC    | LOH8p+               |           | LOH             | LOH             | LOH             | /                | LOH             | /                 |
| 220CHC    | LOH8p+               |           | H               | LOH             | LOH             | LOH              | /               | LOH               |
| 230CHC    | LOH8p+               |           | /               | /               | /               | LOH              | /               | LOH               |
| 235CHC    | LOH8p+               |           | /               | /               | /               | /                | /               | LOH               |
| 273CHC    | LOH8p+               |           | /               | LOH             | /               | /                | /               | LOH               |
| 326CHC    | LOH8p+               |           | H               | LOH             | /               | /                | /               | /                 |
| 327CHC    | LOH8p+               |           | /               | /               | LOH             | LOH              | LOH             | LOH               |
| 335CHC    | LOH8p+               |           | /               | LOH             | /               | /                | LOH             | LOH               |
| 337CHC    | LOH8p+               |           | /               | /               | LOH             | LOH              | /               | LOH               |
| 347CHC    | LOH8p+               |           | /               | /               | LOH             | /                | /               | LOH               |
| 348CHC    | LOH8p+               |           | LOH             | LOH             | /               | /                | /               | /                 |
| 349CHC    | LOH8p+               |           | LOH             | /               | /               | /                | /               | LOH               |
| 352CHC    | LOH8p+               |           | /               | LOH             | /               | LOH              | /               | LOH               |
| 381CHC    | LOH8p+               |           | /               | LOH             | /               | LOH              | /               | /                 |
| 384CHC    | LOH8p+               |           | /               | /               | LOH             | /                | LOH             | /                 |
| 392CHC    | LOH8p+               |           | /               | LOH             | LOH             | /                | LOH             | /                 |
| 395CHC    | LOH8p+               |           | LOH             | LOH             | LOH             | LOH              | LOH             | /                 |
| 427CHC    | LOH8p+               |           | /               | /               | /               | LOH              | LOH             | /                 |
| 432CHC    | LOH8p+               |           | LOH             | /               | /               | /                | /               | /                 |
| 436CHC    | LOH8p+               |           | LOH             | /               | /               | LOH              | /               | LOH               |
| k2CHC     | LOH8p+               |           | LOH             | /               | /               | /                | /               | LOH               |
| k45CHC    | LOH8p+               |           | /               | /               | /               | LOH              | /               | /                 |
| k53CHC    | LOH8p+               |           | H               | LOH             | LOH             | LOH              | LOH             | LOH               |
| GEN118CHC | LOH8p+               |           | /               | /               | /               | LOH              | LOH             | /                 |
| GEN121CHC | LOH8p+               |           | /               | LOH             | /               | LOH              | /               | /                 |
| GEN127CHC | LOH8p+               |           | LOH             | /               | /               | /                | LOH             | LOH               |
| GEN129CHC | LOH8p+               |           | /               | LOH             | /               | LOH              | /               | /                 |
| 38CHC     | LOH8p-               |           | H               | /               | /               | H                | /               | /                 |
| 50CHC     | LOH8p-               |           | H               | H               | /               | H                | /               | /                 |
| 55CHC     | LOH8p-               |           | /               | /               | H               | /                | /               | H                 |
| 106CHC    | LOH8p-               |           | H               | /               | /               | H                | /               | LOH               |
| 107CHC    | LOH8p-               |           | /               | /               | H               | /                | H               | /                 |
| 108CHC    | LOH8p-               |           | /               | H               | /               | H                | H               | /                 |
| 110CHC    | LOH8p-               |           | H               | /               | /               | /                | H               | H                 |
| 111CHC    | LOH8p-               |           | H               | /               | /               | H                | H               | /                 |
| 125CHC    | LOH8p-               |           | H               | /               | H               | /                | H               | /                 |
| 126CHC    | LOH8p-               |           | /               | /               | /               | H                | /               | /                 |
| 128CHC    | LOH8p-               |           | H               | /               | H               | /                | /               | /                 |
| 142CHC    | LOH8p-               |           | H               | H               | /               | H                | /               | /                 |
| 143CHC    | LOH8p-               |           | /               | H               | /               | /                | /               | H                 |
| 145CHC    | LOH8p-               |           | H               | /               | H               | /                | /               | /                 |
| 159CHC    | LOH8p-               |           | /               | H               | /               | /                | /               | /                 |
| 160CHC    | LOH8p-               |           | /               | H               | H               | /                | H               | H                 |
| 165CHC    | LOH8p-               |           | /               | /               | H               | H                | /               | H                 |
| 169CHC    | LOH8p-               |           | H               | H               | /               | /                | /               | H                 |
| 170CHC    | LOH8p-               |           | /               | H               | /               | /                | /               | /                 |
| 171CHC    | LOH8p-               |           | /               | /               | /               | /                | H               | H                 |
| 177CHC    | LOH8p-               |           | /               | /               | /               | H                | /               | H                 |
| 183CHC    | LOH8p-               |           | /               | /               | /               | /                | /               | H                 |
| 197CHC    | LOH8p-               |           | /               | /               | H               | H                | H               | H                 |
| 199CHC    | LOH8p-               |           | H               | /               | H               | /                | /               | /                 |
| 200CHC    | LOH8p-               |           | H               | /               | H               | /                | H               | /                 |
| 203CHC    | LOH8p-               |           | /               | /               | /               | H                | /               | H                 |
| 205CHC    | LOH8p-               |           | /               | H               | /               | /                | /               | /                 |
| 206CHC    | LOH8p-               |           | /               | H               | /               | H                | /               | /                 |
| 231CHC    | LOH8p-               |           | /               | /               | H               | /                | /               | H                 |
| 232CHC    | LOH8p-               |           | /               | H               | H               | H                | /               | H                 |

Four samples homozygous at all sites were removed from the table.

LOH, loss of heterozygosity; H, heterozygosity; /, homozygosity. Previous genotyping performed with microsatellite markers or CGH are mentioned in the corresponding columns.



**Fig. 2 - Genotyping of the PCR products by gel migration and HRM analysis for the InDel markers MID1098b (A, B and C) and MID3084 (D, E and F). For the HRM analysis, baseline fluorescence intensities were rescaled and plotted on the y-axis against temperature (B and E). The differences between melting curve patterns were obtained for each temperature point by subtraction of the average value of the reference curve (heterozygotes) to the normalized relative fluorescence (C and F), leading to a clear separation of samples with the same genotype. Tumor samples with LOH (1T for MID1098b, and 7T for MID3084) were clearly departing from the heterozygote pattern to join the homozygous pattern corresponding to the retained allele.**

in the CSMD1, a gene that has been recurrently found homozygously deleted in various tumor types but has not yet been considered as a tumor suppressor (35). This discrepancy between microsatellite and InDel analysis is thus logical. Furthermore, this result does not prevent the capacity of InDel analysis to predict CIN<sup>+</sup> tumors, since other heterozygous markers in 106CHC were not lost. The specific result indicates that we identified a small terminal or interstitial deletion, events that are not associated with CIN, which involves whole chromosomes or entire

chromosomal arms.

The capacity to investigate InDel markers with HRM analysis is another crucial feature of our work as it means that LOH can be analyzed without casting a gel, an improvement that represents a substantial time gain (39). In addition, this application implies that InDels, as SNPs, can be used as a high throughput approach. In fact, we performed our HRM analysis only on 4 InDel markers that were carefully chosen for their small allelic size difference (10 bp), a condition resembling that of SNPs for which

HRM analysis is commonly used. We did not extend our HRM analysis to markers with larger differences, as we noticed that the software analyzing the melting curves of DNA fragments rapidly lost its capacity of analysis when allelic size differences were too large (data not shown). A future improvement of the software will probably provide a solution to this current limitation.

The implications of the use of InDel markers for assessing chromosomal instability are potentially manifold and we wonder why this technique has not been used (or published) before the present report. In fact, our approach enables less affluent laboratories or less developed health care institutions to diagnose CIN without using radioactive nucleotides or fluorescent dyes, which are associated with environmental and technical limitations. In addition, these markers may provide a renewed independence for their users as opposed to the current way biotechnology companies commercialize their microarrays. The introduction of microarray technology in the clinical practice represented a major breakthrough for scientific knowledge but it also contributed to reducing the number of groups involved in the characterization of cancer genomics. Furthermore, since there is an understandable and widespread tendency to require the use of modern techniques for considering a scientific paper for publication, microarray approaches became for many years an almost mandatory entry-point to publish in the field of genomics. However, as microarray became more and more expensive and resources more limited in many countries, only a few well-established platforms obtained a sufficient budget from funding agencies and published in good journals. The development of surrogate and cheaper techniques to study cancer genomics is thus needed to spare the money of contributors as well as to reduce the conspicuous publications biases engendered by financial disparities. In addition, the development of novel and cheaper

techniques for markers detection may turn out to be an important entry point to implement the practice of personalized medicine in less affluent countries and, in this sense, it could be considered as a true improvement in the field of cancer diagnosis and treatment.

The present work has the limitation of having been performed on a limited number of tumors (n=68) and our conclusions should therefore be considered as still preliminary. Specifically, the methodologies described above should now be studied on other tumor types. In this respect, the analysis of histotypes, known for their important stromal component, will be very informative. In addition, further work is needed to characterize InDels usable in all ethno-geographic backgrounds as well as to identify subsets of markers suitable for both electrophoretic and HRM analyses.

**Financial support:** This work was supported by the French National League Against Cancer (LNCC) and the Pasteur Institutes International Network (RIIP).

**Conflict of interest statement:** None of the authors is linked to this research by proprietary interest.

Address for correspondence:  
Dr. Pascal Pineau  
Unité "Organisation Nucléaire et Oncogénèse"  
Unité INSERM U.993  
Institut Pasteur  
28, Rue du Dr Roux  
75724 Paris Cédex 15, France  
e-mail: pascal.pineau@pasteur.fr

## REFERENCES

- Holland A, Cleveland D. Boveri revisited: chromosomal instability, aneuploidy and tumorigenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009; 10: 478-87.
- Lengauer C, Kinzler K, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 1998; 396: 643-9.
- Swanton C, Caldas C. Molecular classification of solid tumours: towards pathway-driven therapeutics. *Br J Cancer* 2009; 100: 1517-22.
- Walther A, Houlston R, Tomlinson I. Association between chromosomal instability and prognosis in colorectal cancer: a meta-analysis. *Gut* 2008; 57: 941-50.
- Roschke A, Kirsch I. Targeting karyotypic complexity and chromosomal instability of cancer cells. *Curr Drug Targets* 2010; 11: 1341-5.
- Tang Y, Williams B, Siegel J, Amon A. Identification of aneuploidy-selective antiproliferation compounds. *Cell* 2011; 144: 499-512.
- Vogelstein B, Fearon ER, Kern SE, et al. Allelotype of colorectal carcinomas. *Science* 1989; 244: 207-11.
- Knowles M, Elder P, Williamson M, Cairns J, Shaw M, Law M. Allelotype of human bladder cancer. *Cancer Res* 1994; 54: 531-8.
- Kallioniemi O-P, Kallioniemi A, Piper J, et al. Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chrom Cancer* 1994; 10: 231-43.



10. Pinkel D, Seagraves R, Sudar D, et al. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet* 1998; 20: 207-11.
11. Lindblad-Toh K, Tanenbaum D, Daly M, et al. Loss-of-heterozygosity analysis of small-cell lung carcinomas using single-nucleotide polymorphism arrays. *Nat Biotechnol* 2000; 18: 1001-5.
12. Ashktorab H, Smoot D, Farzanmehr H, et al. Clinicopathological features and microsatellite instability (MSI) in colorectal cancers from African Americans. *Int J Cancer* 2005; 116: 914-9.
13. Crowe JJ, Patrick R, Rybicki L, Grundfest-Broniatowski S, Kim J, Lee K. Race is a fundamental prognostic indicator for 2325 northeastern Ohio women with infiltrating breast cancer. *Breast J* 2005; 11: 124-8.
14. Calvo E, Baselga J. Ethnic differences in response to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. *J Clin Oncol* 2006; 24: 2158-63.
15. Ma B, Hui E, Mok T. Population-based differences in treatment outcome following anticancer drug therapies. *Lancet Oncol* 2010; 11: 75-84.
16. Hunt J, Yim J, Carty S. Fractional allelic loss of tumor suppressor genes identifies malignancy and predicts clinical outcome in follicular thyroid tumors. *Thyroid* 2006; 16: 643-9.
17. Schwartz M, Dvorchik I, Roayaie S, et al. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: extension of indications based on molecular markers. *J Hepatol* 2008; 49: 581-8.
18. Huan Z, Nakayama K, Nakayama N, et al. Genetic classification of ovarian carcinoma based on microsatellite analysis: relationship to clinicopathological features and patient survival. *Oncol Rep* 2008; 19: 775-81.
19. Laurent-Puig P, Legoix P, Bluteau O, et al. Genetic alterations associated with hepatocellular carcinomas define distinct pathways of hepatocarcinogenesis. *Gastroenterology* 2001; 120: 1763-73.
20. Marsh J, Finkelstein S, Demetris A, et al. Genotyping of hepatocellular carcinoma in liver transplant recipients adds predictive power for determining recurrence-free survival. *Liver Transpl* 2003; 9: 664-71.
21. Boyault S, Rikman D, de Reyniès A, et al. Transcriptome classification of HCC is related to gene alterations and to new therapeutic targets. *Hepatology* 2007; 45: 42-52.
22. Cordaux R, Batzer M. The impact of retrotransposons on human genome evolution. *Nat Rev Genet* 2009; 10: 691-703.
23. Iskow R, McCabe M, Mills R, et al. Natural mutagenesis of human genomes by endogenous retrotransposons. *Cell* 2010; 141: 1253-61.
24. Baillie J, Barnett M, Upton K, et al. Somatic retrotransposition alters the genetic landscape of the human brain. *Nature* 2011; 479: 534-7.
25. Weber J, David D, Heil J, Fan Y, Zhao C, Marth G. Human diallelic insertion/deletion polymorphisms. *Am J Hum Genet* 2002; 71: 854-62.
26. Mullaney J, Mills R, Pittard W, Devine S. Small insertions and deletions (INDELs) in human genomes. *Hum Mol Genet* 2010; 19: R131-6.
27. Mills R, Pittard W, Mullaney J, et al. Natural genetic variation caused by small insertions and deletions in the human genome. *Genome Res* 2011; 21: 830-9.
28. Reed G, Kent J, Wittwer C. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics* 2007; 8: 597-608.
29. Wittwer C. High-resolution DNA melting analysis: advances and limitations. *Hum Mutat* 2009; 30: 857-9.
30. Pineau P, Marchio A, Battiston C, et al. In human hepatocellular carcinoma, chromosome instability depends on p53 status and aflatoxin exposure. *Mutat Res* 2008; 653: 6-13.
31. Pineau P, Nagai H, Prigent S, et al. Identification of three distinct regions of allelic deletions on the short arm of chromosome 8 in hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 1999; 18: 3127-34.
32. Marchio A, Pineau P, Meddeb-Cherif M, et al. Distinct chromosomal abnormality pattern in primary liver cancer of non-B, non-C patients. *Oncogene* 2000; 19: 3733-8.
33. Cho M, Ciulla D, Klanderma B, Raby B, Silverman E. High-resolution melting curve analysis of genomic and whole-genome amplified DNA. *Clin Chem* 2008; 54: 2055-8.
34. Romanowski T, Sikorska K, Bielawski K. UGT1A1 gene polymorphism as a potential factor inducing iron overload in the pathogenesis of type 1 hereditary hemochromatosis. *Hepatol Res* 2009; 39: 469-78.
35. Toomes C, Jackson A, Maguire K, et al. The presence of multiple regions of homozygous deletion at the CSMD1 locus in oral squamous cell carcinoma question the role of CSMD1 in head and neck carcinogenesis. *Genes Chromosomes Cancer* 2003; 37: 132-40.
36. Midorikawa Y, Yamamoto S, Tsuji S, et al. Allelic imbalances and homozygous deletion on 8p23.2 for stepwise progression of hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 2009; 49: 513-22.
37. Thompson S, Compton D. Chromosomes and cancer cells. *Chromosome Res* 2011; 19: 433-44.
38. Nagai H, Pineau P, Tiollais P, Buendia MA, Dejean A. Comprehensive allelotyping of human hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 1997; 14: 2927-33.
39. Marchio A, Mehdeb M, Pineau P, et al. Recurrent chromosomal abnormalities in hepatocellular carcinoma detected by comparative genomic hybridization. *Genes Chrom Cancer* 1997; 18: 59-65.

## **Abstracts**

### **Associations of Genetic variants in the Transcriptional coactivators EP300 and PCAF with Hepatocellular Carcinoma**

Hepatocellular carcinoma is among the most lethal and prevalent cancers in the human population. HCC affects all segments of the world population, although significant differences in HCC incidence in various countries reflect the regional differences in the prevalence of specific aetiological factors as well as ethnicity. The most prominent factors associated with HCC include chronic hepatitis B and C viral infection chronic alcohol consumption, aflatoxin-B1- and virtually all cirrhosis-inducing conditions. Other aetiological factors have also been proposed to lead to HCC, genetic and genomic events can be associated with the development of HCC. The aim of the current study was to assess the impact of the Ile997Val in EP300 and Asn386Ser in PCAF polymorphisms on the risk of HCC. It appears that variants of the transcriptional coactivator genes (*EP300* and *PCAF*) may influence HCC risk in populations with low mutations or chromosomal instability rates.

**Key words:** HCC, EP300, PCAF, polymorphism.

### **Hepatitis C Virus promotes Septin 9 assembly in filament, microtubule organization and lipid droplets accumulation through recruitment of PIAS1.**

Several host proteins have been proposed to facilitate the replication of HCV however much is needed to elucidate the implicated mechanisms. Here we report that HCV infection increases expression and formation of septin 9 filament surrounding HCV core. PIAS1 (protein inhibitor of activating STAT1) was also enriched in these core clusters. Reciprocally knock down of septin 9 and PIAS1 severely reduced core expression, lipid droplets accumulation and virus replication. Septin 9 assembly in filaments and its effects on lipid droplet and microtubules are dependent of PIAS1. Moreover siRNA of SUMO1 affected septin expression, suggesting that the regulatory function of PIAS1 on septin 9 structure and function might depend on sumoylation. Thus we identified targets that settle the relationship between HCV and its host cell and opened new therapeutic directions.

**Key words:** HCV, Septin9, PIAS1, SUMO1, Microtubules, lipid droplets.