



Thèse présentée pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Strasbourg

Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie
Option Biologie Moléculaire et Cellulaire

par Sophie KRIEGER

**Contribution à l'étude du rôle de l'apolipoprotéine E et de la
protéine de jonction claudine 1 comme nouvelles cibles
thérapeutiques au cours de l'infection par le
virus de l'hépatite C.**

Présentée et soutenue publiquement le 17 Décembre 2009

Membres du jury :

Rapporteur externe	:	Dr. Thérèse ASTIER-GIN, CR CNRS UMR 5234, HDR, Université de Bordeaux 2
Rapporteur externe	:	Dr. David DURANTEL, CR INSERM U871, HDR, Lyon
Rapporteur interne	:	Pr. Philippe GEORGEL, PU, Université de Strasbourg
Directeur de Thèse	:	Dr. Catherine SCHUSTER, CR INSERM U748, HDR, Strasbourg
Co-directeur de Thèse	:	Pr. Thomas BAUMERT, PU-PH, INSERM U748, Université de Strasbourg
Examineur	:	Pr. Catherine FLORENTZ, PU, Université de Strasbourg

Les plus importantes découvertes scientifiques sont le résultat de la patiente observation de petits faits subsidiaires, si particuliers, si menus, inclinant si imperceptiblement les balances que l'on ne consentait pas jusqu'alors à en tenir compte.

André Gide

Remerciements

Je voudrais remercier les membres du jury de me faire l'honneur de juger ce travail de thèse, Le Dr. Thérèse Astier-Gin et le Dr. David Durantel en qualité de rapporteurs externes, ainsi que le Pr. Philippe Georgel en qualité de rapporteur interne. Je voudrais également remercier le Pr. Catherine Florentz d'avoir accepté de faire partie du jury en qualité d'examineur malgré son emploi du temps chargé.

Merci au Pr. Thomas Baumert, directeur de l'unité U748 de m'avoir accueillie au sein de son unité. Merci, pour votre encadrement et votre dynamisme.

Je tiens également à remercier ma directrice de thèse, le Dr. Catherine Schuster de m'avoir donné ma chance et d'avoir encadré ce travail de thèse même si cela n'a pas été facile tous les jours. Merci aussi pour ta disponibilité et tes nombreux conseils. Plus jamais je n'oublierai les témoins !

Catherine, Thomas, vous avez été tous les deux de supers encadrants.

Pour moi, ce manuscrit marque l'aboutissement de trois années de thèse, de travail intense et enrichissant tant au point de vue scientifique qu'au point de vue personnel. En effet, tout ceci n'aurait pas été possible sans la présence de "vrais amis".

Merci à Maria, Marie et Eric pour leurs nombreux conseils à la paillasse. Les RT-PCR et surtout le corbett vont beaucoup me manquer... A Nicolas, qui a connu les débuts de la RT-PCR au laboratoire, merci pour sa gentillesse et son humour. Merci encore à Maria, Marie, Eric et Anne pour tous ces moments passés ensemble; tous les midis à la cantine ou au resto pour les jours de fête ou pour nous remonter le moral. Les nombreux fous rires que nous avons eus et toutes ces expressions et mots inventés (il faudrait peut-être penser à les noter).

Merci à Christine pour m'avoir appris beaucoup de choses en biologie cellulaire, pour le coaching P3 et pour les pauses chocolat noir-sésame ; cela va me manquer.

Merci à Cathy pour son efficacité et ses conseils en immunofluorescence et microscopie. Tu m'as donné envie de continuer à faire de la microscopie.

Merci à Mirjam pour ses conseils, sa disponibilité ainsi que pour les nombreuses heures passées au P3 à faire des cinétiques.

Merci à Mélanie pour ses conseils avisés, ces petits moments de papotage et je te souhaite bonne chance pour la suite.

Merci à Eva, Viet Loan Dao Thi, Marlène Dreux et François-Loïc Cosset, Christopher Davis, Christopher Mee, Helen Herris et Jane McKeating, Eberhard Hildt, Guangxiang Luo et John McLauchlan pour leur inestimable contribution scientifique.

Merci à Corinne, Dominique, Jeremy, Patricia, Richard et Sigis ainsi qu'à Alvaro et Rosalba pour leur indispensable aide à la vie du laboratoire.

Merci à Catherine C, Joëlle et Véronique pour leur efficacité. Et particulièrement, un très grand merci à Françoise pour avoir su gérer avec diplomatie la réservation de la salle pour le jour J.

Merci à Evelyne pour sa gentillesse et sa disponibilité.

Merci à tous les occupants du bureau des thésards, ainsi qu'à ceux qui n'y sont plus, pour la bonne ambiance : Alizée, Karine, Christine, Daniel, Fei, Frédéric, Isabel, Joachim, Joseph, Karine, Laetitia, Marie W, Marina, Maryse D, Maryse P, Xu Ke.

Merci également à tous ceux qui sont au rez-de-jardin et que l'on ne voit pas souvent : Aurélie, Céline, Eric R, Heidi, Jochen, Laurent, Marine, Nauman et Rémy. Merci à toute l'équipe des pp, Isabel, Michèle, Patric, Samira et Jean-Pierre Martin. Isabel, merci d'avoir continué le projet et bonne chance pour l'avenir.

Merci aux deux équipes HIV, Alexandre, Christiane, Géraldine, Julien, Thomas D, Sylvie et Vincent, Christian, Laetitia, Olivier, Sultan, Thomas C et Valentin pour tous les bons moments passés au labo et surtout au P3.

Merci aux filles du diag pour leur bonne humeur ainsi que pour les nombreux gâteaux et petits pains.

Merci à toute l'équipe du forum BIOTechno 2008 : Aurore, Céline, Emilie, Isabelle, Jessica, Mathieu et Nathanaël avec qui j'ai découvert les joies de l'organisation d'un forum, ainsi que le monde de l'entreprise.

Merci à Michel Labouesse et Laurence Drouard pour avoir proposé à Emmanuelle et moi-même le projet OpenLAB. Merci aussi à Catherine Florentz pour son soutien au projet. Merci, Pascal pour la mise en place du site web. Ce fût une expérience très enrichissante et une très belle histoire. Je souhaite une longue vie à OpenLAB et une bonne continuation à tous les moniteurs qui font et ont fait partie de l'aventure.

Merci également à tous mes amis de promo et d'ailleurs : Aurélien, Anne, Benoit, Edwina, Gaby, Gemma, Gila, Guillaume, Myriam, Steph, Pape, Pascale, Yann, Vivi, Wassim... pour les moments inoubliables : les vacances, les fous rires, les soirées au Coco-Lobo, entre autres.

Merci à Emilie pour son soutien dans les derniers moments de rédaction et je te souhaite tout le bonheur du monde.

Merci à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à ce travail de thèse et que j'ai oubliés de citer.

Un grand merci à mon Papa et à ma Maman pour leur soutien tout au long de ces années, ainsi qu'à toute ma famille et amis de la famille.

Un dernier merci à Jérôme pour s'être occupé de moi et surtout de m'avoir supportée durant ces derniers mois de stress intense.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	9
I. L'HEPATITE C	12
1. Découverte de l'agent responsable de la maladie	12
2. Epidémiologie	12
3. Modes de transmission.....	13
4. Techniques de diagnostic	14
5. Physiopathologie.....	14
5.1. Evolution de la maladie et symptômes cliniques	15
5.1.1. Hépatite C aigüe	15
5.1.2. Hépatite C chronique	15
5.1.3. Les manifestations extra-hépatiques.....	16
5.2. Réponse immunologique de l'hôte et persistance virale	17
5.2.1. Réponse immunitaire non spécifique.....	17
5.2.2. Réponse immune spécifique	20
6. Traitements et thérapeutiques	23
7. Le foie, un organe cible du VHC	26
7.1. Populations cellulaires du foie.....	26
7.2. Métabolisme des lipoprotéines.....	27
7.2.1. Structure et fonction des lipoprotéines.....	28
7.2.2. Les apolipoprotéines.....	29
7.2.3. Assemblage des VLDL.....	30
II. LE VIRUS DE L'HEPATITE C (VHC)	31
1. Classification et variabilité génomique	31
2. Propriétés biophysiques de la particule virale.....	33
3. Organisation du génome	34
3.1. Régions non traduites	34

3.1.1. La région 5' non traduite (5'NTR)	34
3.1.2. La région 3' non traduite (3'NTR)	35
3.2. Les protéines virales	35
3.2.1. La protéine core.....	36
3.2.2. La protéine ARFP.....	37
3.2.3. Les protéines E1 et E2	38
3.2.4. La protéine p7	38
3.2.5. La protéine NS2	39
3.2.6. La protéine NS3-NS4A	40
3.2.7. La protéine NS4B	40
3.2.8. La protéine NS5A	41
3.2.9. La protéine NS5B	43
III. LES MODELES D'ETUDES	44
1. Les modèles animaux	44
1.1. Le chimpanzé.....	44
1.2. Les autres modèles	45
2. Les modèles <i>in vitro</i>	45
2.2. Les glycoprotéines solubles.....	45
2.3. Les virus like-particules	46
2.4. Les pseudo-particules du VHC	46
2.5. Les réplicons subgénomiques et génomiques.....	47
2.6. Les particules du VHC produites en culture cellulaire	49
IV. LE CYCLE VIRAL	51
1. Entrée	51
1.1. Les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2.....	51
1.2. Les molécules d'attachement	54
1.2.1. Les glycosaminoglycanes	54

1.2.2. Le récepteur des LDL.....	55
1.2.3. Les lectines de type C.....	55
1.3. Les récepteurs.....	56
1.3.1. CD81.....	56
1.3.2. SR-BI	57
1.3.3. Claudines.....	58
1.3.4. Occludine.....	63
1.4. Modèle d'entrée du VHC	64
2. Internalisation de la particule virale et fusion.....	65
3. Traduction de la polyprotéine virale.....	66
4. Maturation de la polyprotéine	67
5. Réplication de l'ARN viral	68
6. Assemblage et sécrétion des particules virales	71
6.1. Association des lipoprotéines et VHC.....	72
6.2. Rôle des gouttelettes lipidiques et des VLDL dans l'assemblage et sécrétion du VHC.....	73
6.3. La stéatose associée au VHC et métabolisme lipidique.....	75
OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE.....	77
RESULTATS	81
ARTICLE 1 : L'apolipoprotéine E interagit avec la protéine non-structurale NS5A du VHC et est requise pour l'assemblage des particules virales infectieuses.....	83
ARTICLE 2 : L'inhibition de l'infection du VHC par des anticorps anti-CLDN1 est médiée par la neutralisation de l'association E2-CD81-CLDN1.....	99
DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	117
PARTIE I	119
PARTIE II	129

CONCLUSION.....	139
BIBLIOGRAPHIE	143

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Prévalence du VHC à travers le monde	13
Figure 2: Histoire naturelle de l'infection par le VHC	15
Figure 3: Réponse de l'hôte à l'infection par le VHC	18
Figure 4 : Voie de signalisation de l'IFN de type I, II et III	19
Figure 5 : Architecture du parenchyme hépatique.....	26
Figure 6 : Schéma du métabolisme des lipoprotéines.....	28
Figure 7 : Assemblage et sécrétion des VLDL	30
Figure 8 : Distribution géographique des différents géotypes du VHC.....	32
Figure 9 : Représentation schématique du VHC.....	33
Figure 10 : Structures secondaires des régions 5' et 3' NTR du VHC	34
Figure 11 : Les protéines du VHC et leur association avec la membrane du RE.....	35
Figure 12 : Modèle de la conformation de la protéine core et de sa localisation aux gouttelettes lipidiques	36
Figure 13 : Structure 3D du canal p7.....	38
Figure 14 : Structure du domaine NS2 catalytique après clivage par la protéase NS2/3	39
Figure 15 : Modèle de la conformation de la protéine NS5A à la membrane du RE.....	41
Figure 16 : Représentation schématique de la protéine NS5A	42
Figure 17 : Production de pseudo-particules VHCpp.....	47
Figure 18 : Représentation schématique du système "réplicon VHC"	48
Figure 19 : Représentation schématique du système "VHCcc"	49
Figure 20 : Cycle viral du VHC	51
Figure 21 : Représentation schématique des glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 du VHC avec leurs sites de glycosylation	52
Figure 22 : Structure de CD81	56
Figure 23 : Structure de la protéine SR-BI	57
Figure 24 : Structure de la protéine de jonction CLDN1.....	59
Figure 25 : Modèle d'assemblage des CLDNs dans les jonctions serrées	60
Figure 26 : Schéma d'une jonction serrée	62
Figure 27 : Structure de la protéine de jonction OCLN	63
Figure 28 : Modèle d'entrée du VHC.	64
Figure 29 : Modèle de formation du complexe d'initiation de la traduction médiée par l'IRES du VHC.....	66
Figure 30 : Organisation du génome, maturation de la polyprotéine du VHC et localisation des protéines au niveau du RE	68
Figure 31 : Réseau membranaire siège de réplication du VHC et modèle de formation du CR du VHC	69

Figure 32: Modèle d'assemblage et de sécrétion des particules virales du VHC.....	73
Figure 33 : Description des chimères CLDN7/CLDN1 utilisées pour la caractérisation des anticorps anti-CLDN1	132
Tableau 1 : Caractéristiques biophysiques et biochimiques des lipoprotéines.	29

ABREVIATIONS

ADNc	ADN complémentaire
ALAT	Alanine aminotransférase
Apo	Apolipoprotéine
ARFP	Alternate reading frame protein
CLDN	Claudine
CR	Complexe de réplication
DC	Cellule dendritique
EIAs	Essais immunoenzymatiques
eIF	Eukaryotic initiation factor
EL1 et 2	Extracellular loop 1 et 2
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
GFP	Green fluorescent protein
GAG	Glycosaminoglycane
GBV-B	GB virus B
HDL	High density lipoprotein
HVR	Région hyper variable
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
INF	Interféron
IRES	Site d'entrée interne du ribosome
IRF-3	Interferon regulatory factor 3
ISG	Interferon stimulated gene
JFH-1	Japanese Fulminant Hepatitis 1
LDL	Low density lipoprotein
LDL-R	Récepteur aux LDL
LPL	Lipoprotéine lipase
mDC	Cellule dendritique myeloïde
MHC-I et -II	Complexes majeurs d'histocompatibilité I et II
MTP	Protéine de transfert microsomal
NK	Cellules Natural Killer
NS	Protéines non-structurales du virus de l'hépatite C
NTR	Région non traduite
OCLN	Occludine
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
pDC	Cellule dendritique plasmacytoïde
PTB	Polypyrimidine tract-binding protein

RE	Réticulum endoplasmique
RIG-1	Retinoic acid inducible gene 1
RT-PCR	Réaction reverse de polymérisation en chaîne
SCID	Immunodéficience sévère combinée
sE2	Forme soluble de la glycoprotéine E2 du VHC
siARN	ARN interférent
SL	Stem loop
SP	Signal peptidase
SPP	Signal-peptide peptidase
SR-BI	Scavenger receptor class B type I
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TGF- α	Tumor growth factor- α
TLR	Toll-like receptor
VAP	Protéine associée aux vésicules
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
VHA	Virus de l'hépatite A
VHB	Virus de l'hépatite B
VHC	Virus de l'hépatite C
VHCcc	Système de propagation du VHC en culture cellulaire
VHCpp	Pseudo-particules de VHC
VLDL	Very low density lipoprotein
VLP	Virus Like particules

INTRODUCTION

Le virus de l'Hépatite C (VHC) est à l'origine d'une pandémie ayant des conséquences dramatiques en matière de santé publique mondiale. En effet, ce virus, avec une prévalence de 3%, infecte plus de 180 millions de personnes dans le monde dont 130 millions sont porteurs chroniques. L'évolution silencieuse de la maladie et la fréquence élevée de passage à la chronicité expliquent l'existence d'un grand réservoir de sujets infectés.

L'hépatite C est responsable de la majorité des hépatites chroniques, des cirrhoses non alcooliques et des hépatocarcinomes cellulaires diagnostiqués dans le monde. La cirrhose virale C est la principale indication de transplantations hépatiques dans les pays industrialisés. De plus, les perspectives liées à l'impact de ces maladies dans les prochaines décennies ne sont pas optimistes car on prévoit une augmentation constante du nombre de cas de cancers hépatiques dus au VHC jusqu'en 2025.

Le traitement actuel proposé aux patients atteints d'hépatite C est non spécifique, souvent mal toléré et coûteux. Son efficacité limitée, l'échec du traitement pour de nombreux malades et l'absence de vaccin rend la recherche de nouvelles solutions thérapeutiques indispensable.

Le virus se transmet essentiellement par voie parentérale et son tropisme est préférentiellement restreint aux hépatocytes humains. Une des voies de recherches développées actuellement et à laquelle nous participons est la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques. Pour cela les axes de recherches mis en place ne ciblent plus essentiellement le virus lui-même mais s'étendent à la compréhension des nombreuses et spécifiques interactions établies entre le virus et son hôte afin que le pathogène puisse persister dans le foie infecté.

Les travaux de thèse présentés dans ce manuscrit se sont intéressés à deux étapes clés du cycle de vie du VHC pour lesquelles des interactions spécifiques avec la cellule hôte sont nécessaires, à savoir, l'étape de l'entrée du virus dans l'hépatocyte et l'étape d'assemblage et de production de virus par cette même cellule.

L'introduction fait le point sur les connaissances actuelles concernant l'hépatite C et son agent étiologique, les résultats inhérents à nos travaux sont présentés sous forme d'articles scientifiques d'ores et déjà acceptés à la publication, finalement la dernière partie présente les perspectives liées à ce sujet.

I L'HEPATITE C

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 collaborateurs observèrent que certains patients étaient séronégatifs pour le virus de l'hépatite A et B. Ils en déduisirent l'existence d'un agent inconnu pouvant causer des hépatites non A non B (NANBH) (Feinstone *et al.*, 1975).

En 1978, Alter et son équipe réussirent à infecter des chimpanzés à partir des sérums de patients ayant une hépatite NANBH (Alter *et al.*, 1978). Mais aucune technique classique ne permit l'isolement d'antigènes, ou de particules infectieuses.

Dix ans plus tard, Choo *et al.*, produisirent une banque d'expression d'ADNc, à partir du sérum de ces chimpanzés infectés, puis criblèrent cette banque avec des sérums de patients atteints de NANBH (Choo *et al.*, 1989). Cet ingénieux procédé a permis d'identifier les caractéristiques moléculaires de l'agent causal des NANBH, que nous appelons aujourd'hui le virus de l'Hépatite C. Cette découverte permit de mettre au point un dépistage ELISA, mettant ainsi fin à la première cause de transmission du VHC, à savoir, la transfusion sanguine.

2. Epidémiologie

L'Organisation Mondiale de la Santé estime que 170 millions de personnes dans le monde, soit une prévalence de 3%, sont infectées par le VHC dont 130 millions sont porteurs chroniques et risquent de développer une cirrhose ou un hépatocarcinome (HCC).

Bien que le VHC soit endémique dans le monde entier, il existe une grande variabilité géographique de sa distribution (Figure 1). Dans les pays industrialisés, la prévalence de la maladie est faible (<1%) en Australie, au Canada et en Europe du Nord. Elle est d'environ 1% dans les pays d'endémicité moyenne, comme les USA et la plupart de l'Europe. Mais elle est élevée (>2%) dans de nombreux pays d'Afrique, d'Amérique latine et centrale et du Sud-Est asiatique. Dans ces pays, la prévalence oscille entre 5% et 10% voire parfois plus.

En France on estime que 550 000 à 600 000 personnes sont porteuses du VHC, soit 1 à 1,2% de la population.

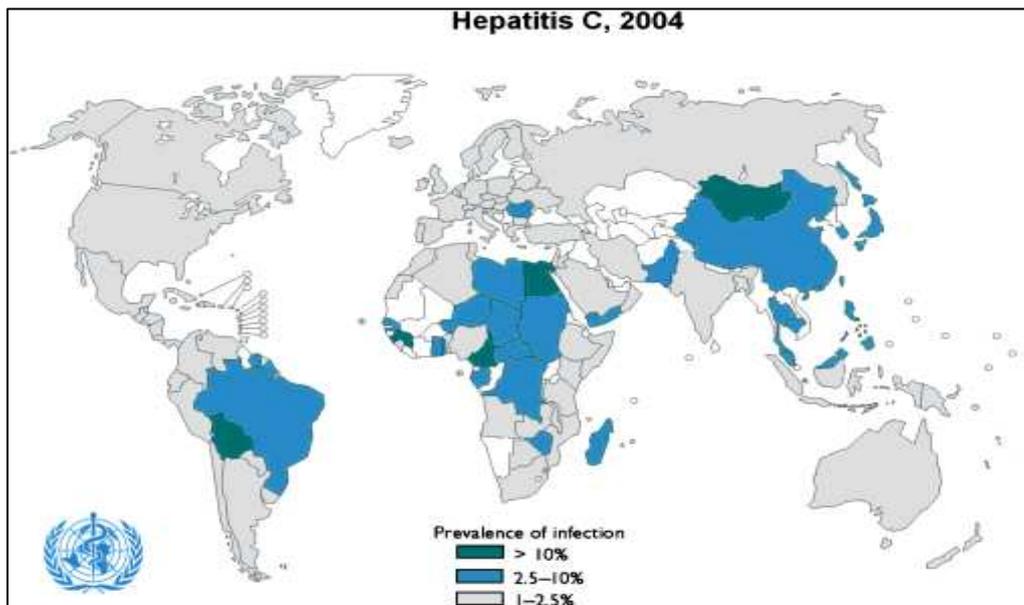


Figure 1 : Prévalence du VHC à travers le monde (source OMS 2004).

3. Modes de transmission

La transmission du VHC se fait essentiellement par voie parentérale. Avant le développement des tests sérologiques en 1991, permettant le dépistage systématique des dons du sang, les transfusions ainsi que les transplantations étaient les principaux modes de transmission du VHC.

Actuellement, dans les pays développés la principale cause de transmission du VHC est la toxicomanie par voie intraveineuse et nasale. La prévalence des anticorps anti-VHC varie de 30% à 98% dans la population toxicomane européenne selon que les individus s'injectent la drogue ou non (Roy *et al.*, 2002). Par contre, la moyenne d'incidence de séroconversion anti-VHC à partir d'une exposition accidentelle au sang contaminée en milieu médical n'est que de 1% à 2%.

Le risque de transmission du VHC lors d'injections thérapeutiques est presque nul dans les pays industrialisés mais reste encore importante dans les pays en voie de développement. En effet, l'utilisation de seringues contaminées, au cours des grandes campagnes de traitement contre la bilharziose entre 1960 et 1987 en Egypte, est la cause d'une prévalence extrêmement élevée (15% à 20%) (Alter, 2007).

D'autres cas de transmission de l'infection de l'Hépatite C ont été reportés lors d'actes médicaux comme l'endoscopie ou la dialyse, mais aussi l'utilisation de matériel chirurgical ou dentaire mal aseptisé. L'acupuncture, le tatouage et le piercing représentent également un risque de contamination non négligeable (Alter, 2007).

Les relations sexuelles avec un partenaire infecté ou des pratiques sexuelles à risque sont également des causes de transmission du VHC (Alter, 2007). La transmission verticale, mère-enfant, est le mode de transmission le plus fréquent chez les enfants

(Alter, 2007). Toutefois, les enfants résolvent spontanément l'infection dans environ 50% des cas.

Pour environ 20% des cas, aucun mode de transmission n'a été rapporté (Alter, 2007).

4. Techniques de diagnostic

Le diagnostic virologique, à partir du sérum ou du plasma de patients, repose sur des tests directs, de biologie moléculaire, permettant la détection d'ARN VHC et des tests indirects, de sérologie, permettant la détection d'anticorps anti-VHC (Chevaliez and Pawlotsky, 2007).

Les tests sérologiques utilisés sont basés sur l'utilisation de tests immuno-enzymatiques de troisième génération (EIAs), qui permettent de détecter des anticorps dirigés contre les différents génotypes du VHC (Chevaliez and Pawlotsky, 2007). Ces anticorps sont détectables à partir de sept à huit semaines après l'infection. La spécificité des tests EIAs de troisième génération est supérieure à 99% (Chevaliez and Pawlotsky, 2007). En général, si le résultat est positif ou douteux il faut le confirmer par la détection de l'ARN viral.

Les tests moléculaires reposent sur la détection de l'ARN VHC. Ce test peut se faire dès le septième jour après l'infection. Ces méthodes de biologie moléculaire incluent des tests qualitatifs (bDNA), pour la détection d'ARN viral présent dans les fluides corporels, et des tests quantitatifs (RT-PCR), pour la détermination de la charge virale (Chevaliez and Pawlotsky, 2007).

En plus, pour les candidats à une thérapie antivirale une détermination du génotype est réalisée de manière systématique (Chevaliez and Pawlotsky, 2007).

5. Physiopathologie

L'Hépatite C est une maladie progressive, la phase aiguë évolue vers une hépatite chronique, qui à long terme peut conduire à la cirrhose et à l'hépatocarcinome (Figure 2).

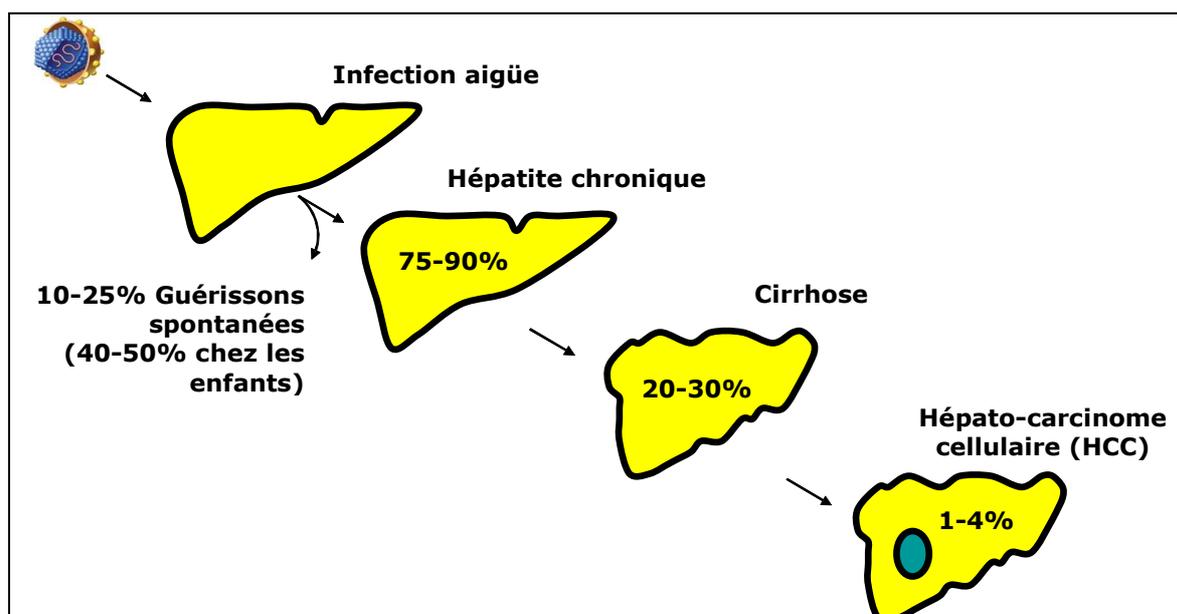


Figure 2: Histoire naturelle de l'infection par le VHC.

5.1. Evolution de la maladie et symptômes cliniques

5.1.1. Hépatite C aiguë

L'ARN viral peut être détecté entre une et trois semaines suivant l'infection. La phase aiguë est définie par une virémie positive, (détection d'ARN VHC dans le sang du patient) et par une sérologie négative (NIH Consensus Statement on Management of Hepatitis C 2002). Bien que dans la plupart des cas l'hépatite C aiguë soit asymptomatique, environ 20% des patients développent des symptômes caractéristiques d'une hépatite (nausée, ictère, vomissement, anorexie). La période d'incubation est courte, de 4 à 12 semaines et est suivie d'une élévation des transaminases (ALAT) (NIH Consensus Statement on Management of Hepatitis C 2002). Quinze à 30% des cas d'hépatites aiguës guérissent spontanément car une réponse immunitaire efficace s'est mise en place. L'infection est résolutive le plus souvent en moins de six mois. Le passage à la chronicité s'observe dans 80% des cas (NIH Consensus Statement on Management of Hepatitis C 2002).

5.1.2. Hépatite C chronique

L'hépatite C chronique est définie par la persistance de l'ARN viral au-delà de six mois avec une élévation des ALAT et l'apparition de signes histologiques (NIH Consensus Statement on Management of Hepatitis C 2002). Le VHC va échapper au système immunitaire et établir une infection chronique, qui restera asymptomatique dans la majorité des cas, bien que la plupart des porteurs chroniques présentent des anomalies histologiques, observées lors de biopsies du foie. C'est la biopsie qui va établir la gravité de l'atteinte du tissu hépatique. 5% des personnes infectées resteront porteurs sains alors que 90% développeront une hépatite chronique dont l'histoire naturelle évoluera

dans 20% des cas vers une cirrhose, sur une période de 20 ans en moyenne, avec un développement possible, dans 4% des cas, en carcinome hépatocellulaire (HCC) (NIH Consensus Statement on Management of Hepatitis C 2002;Lavanchy, 2009).

Le passage à la phase chronique est dépendant d'un certain nombre de facteurs, tels que le sexe, l'âge, certains gènes du complexe majeur d'histocompatibilité, la co-infection VIH ou VHB (NIH Consensus Statement on Management of Hepatitis C 2002;Lavanchy, 2009;Singh *et al.*, 2007). Il existe peu de preuves sur le fait que les facteurs viraux, charge virale ou génotype, ont une incidence sur le risque de progression de la maladie fibreuse vers la cirrhose (Lavanchy, 2009). Cependant, de nombreux facteurs d'hôte augmentent ce risque, comme l'âge au moment de l'infection, un état immunodéprimé. De plus, la consommation d'alcool, suffisant au développement d'une cirrhose, est considérée comme un facteur aggravant du pronostic de la maladie (NIH Consensus Statement on Management of Hepatitis C 2002;Shepard *et al.*, 2005).

Les sujets porteurs d'une infection VHC ont un risque de 20% à 30% plus élevé de présenter un diabète de type 2 et cela d'autant plus qu'ils sont obèses ou atteints d'une fibrose sévère. Les troubles métaboliques associés à l'infection VHC seraient liés à une action directe du virus C sur les voies de signalisation de l'insuline (Negro and Alaei, 2009). De plus, les troubles métaboliques sont susceptibles d'influencer l'histoire naturelle de l'infection VHC (Negro and Alaei, 2009). Ainsi, l'obésité et l'insulinorésistance sont associées à une progression plus rapide de la fibrose en cas d'infection VHC. De même, le diabète et l'insulinorésistance sont des facteurs de mauvaise pronostics aux thérapeutiques antivirales (Negro and Alaei, 2009).

5.1.3. Les manifestations extra-hépatiques

De nombreuses manifestations extra-hépatiques, souvent d'origines immunologiques, ont été rapportées dans l'histoire naturelle du VHC (Galossi *et al.*, 2007).

La cryoglobulinémie est le syndrome le plus couramment associé à l'infection par le VHC et est présente chez 19% à 50% des patients ayant une hépatite C chronique (chiffres variant selon les études) (Galossi *et al.*, 2007). Cette maladie se caractérise par la formation de cryoglobulines, immunoglobuline (Ig) anormales qui précipitent à une température inférieure à 37°C, pouvant toucher la peau, les reins et le système nerveux (Galossi *et al.*, 2007). Ces cryoprécipités contiennent de grandes quantités d'antigènes VHC et/ou des anticorps anti-VHC.

L'infection par le VHC est également associée à des troubles dermatologiques tels que la porphyrie cutanée tardive, lichen plan et des troubles de la thyroïde, hypothyroïdie en général (Galossi *et al.*, 2007).

5.2. Réponse immunologique de l'hôte et persistance virale

La réponse immunitaire face aux agents pathogènes implique les différents éléments du système immunitaire, tels l'immunité innée, humorale et cellulaire. C'est pourquoi, la qualité de la réponse immunitaire est essentielle pour la guérison ou la persistance de l'infection par le VHC.

5.2.1. Réponse immunitaire non spécifique

Dans les premiers stades de l'infection par le VHC, la réponse immunitaire non spécifique est induite. Les interférons de type I (IFN- α/β) sont produits par les hépatocytes infectés par le VHC et par les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) (Hiroishi *et al.*, 2008).

La production d'IFN de type I, par les hépatocytes infectées, résulte de la reconnaissance, par des récepteurs cellulaires spécifiques, de régions ARN double brin. Ces régions sont reconnues comme des signatures PAMP (pathogen-associated molecular pattern) (Figure 3). Les récepteurs sont TLR3 (toll-like receptor 3), à la surface des cellules, et RIG-1 (retinoic acid inducible gene 1), à l'intérieur des cellules (Figure 3). L'engagement de ces récepteurs conduit à l'activation des facteurs de transcription, IRF-3 (interferon regulatory factor 3) et NF- κ B (nuclear factor κ B), permettant la sécrétion d'IFN- α/β par les cellules infectées (Figure 3) (Gale, Jr. and Foy, 2005). L'activation de NF- κ B induit aussi la production de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines qui vont amplifier la réponse inflammatoire et faciliter le recrutement des leucocytes (Gale, Jr. and Foy, 2005). Ces leucocytes agissent de concert avec les IFN de type I, dans la réponse immunitaire de l'hôte contre le VHC.

Par ailleurs, les IFN sécrétés agissent par voie paracrine et autocrine en se fixant aux récepteurs de l'IFN- α/β et activant ainsi la voie Jak-STAT (Figure 3) (Gale, Jr. and Foy, 2005). Cette voie va à son tour activer la transcription des gènes induits par l'IFN (ISG). Ces gènes sont des effecteurs de la réponse de l'hôte à l'infection virale. L'activation par voie paracrine des ISG, au niveau des cellules voisines non infectées, permet de limiter la propagation du virus (Gale, Jr. and Foy, 2005).

La production d'IFN de type I a pour but d'améliorer l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I à la surface des cellules présentatrices d'antigène, comme les DCs, et de renforcer la réponse immunitaire cellulaire (Hiroishi *et al.*, 2008). La réponse cellulaire inclut l'activation des cellules tueuses, natural killer (NK) et des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques (CTL), induisant des lésions hépatiques. À son tour, la mort des hépatocytes stimule les cellules dendritiques myéloïdes (mDC) qui favorisent la sécrétion d'IFN- γ par l'activation des cellules NK et les cellules NKT (cellules ayant des caractéristiques de cellule tueuses et de cellule T). L'IFN- γ active alors les

macrophages hépatiques, ceci afin d'améliorer l'inflammation locale (Hiroishi *et al.*, 2008).

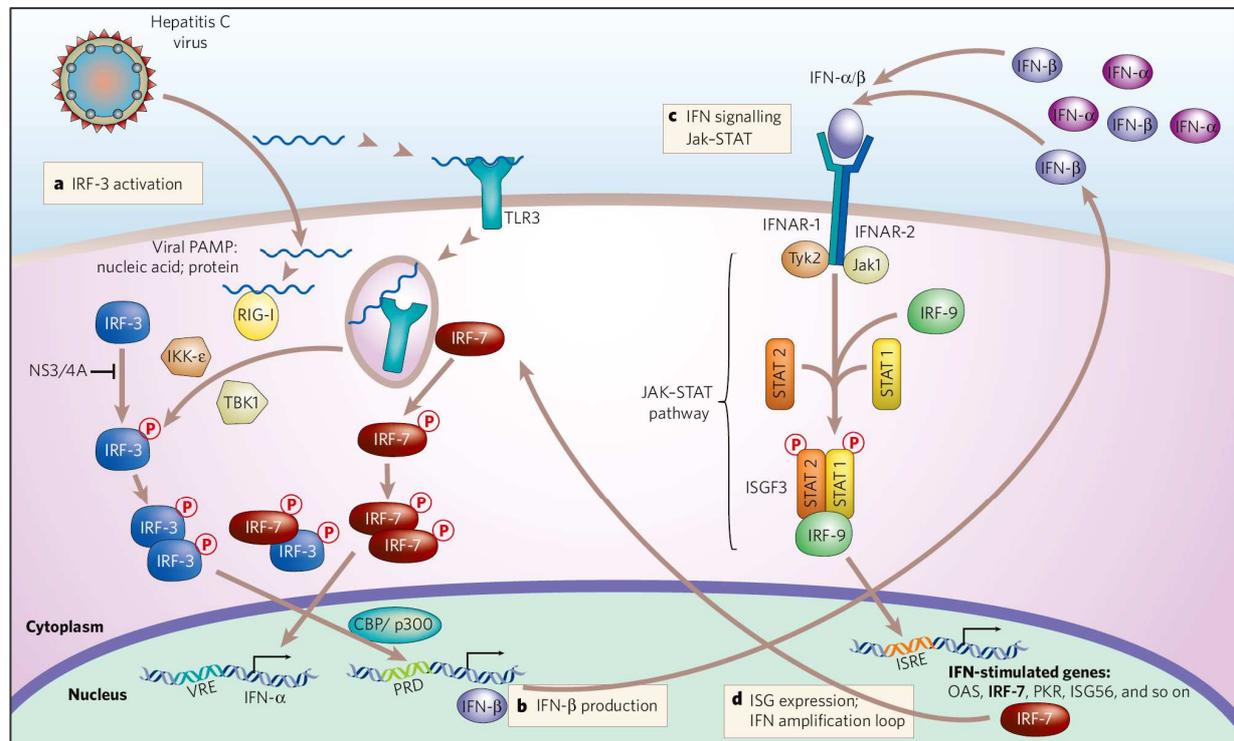


Figure 3: Réponse de l'hôte à l'infection par le VHC (d'après Gale and Foy 2005).

Le VHC semble utiliser plusieurs mécanismes pour subvertir la réponse IFN endogène et rendre les DC inefficaces.

Ces dernières années, il a été démontré que le VHC serait capable de moduler les défenses antivirales des cellules infectées, c'est-à-dire les voies de signalisation menant à la synthèse d'IFN de type 1 et à d'autres ISG, qui ont un potentiel antiviral (Gale, Jr. and Foy, 2005) (Figure 3).

La protéase NS3/4A est un antagoniste de l'activation d'IRF-3 et de l'expression de l'IFN-β car elle bloque la signalisation RIG-1 et TLR-3 (Gale, Jr. and Foy, 2005). Ceci a des conséquences multiples liées à la diminution de la production d'IFN dans les hépatocytes et au blocage de la voie d'amplification des PAMP liée à l'IFN. Parmi les ISG, la modification de l'expression du CMH-I induit la perturbation de la présentation des antigènes (Der *et al.*, 1998). La perte de l'activation de NF-κB conduit notamment à la dérégulation de l'expression de nombreuses cytokines et chimiokines (Foy *et al.*, 2005). L'expression de la protéine core, dans des cellules en culture, se trouve associée à une augmentation du niveau d'expression de la protéine SOCS-3 (suppressor of cytokine signalling) (Bode *et al.*, 2003; Bode *et al.*, 2007). Les SOCS sont des inhibiteurs de la voie Jak-STAT qui rétro-régulent négativement la voie de signalisation des récepteurs à l'IFN-α/β, mais leur rôle exact dans l'infection par le VHC n'est pas connu. La protéine NS5A

est également un antagoniste de l'IFN et semble réguler l'expression des ISG (Bode *et al.*, 2007). L'expression de NS5A, *in vitro*, peut supprimer l'action de l'IFN- α et restaurer une réplication efficace (Macdonald and Harris, 2004).

Un autre type d'interféron de type III - l'IFN- λ , induit également la suppression de la réplication de certains virus tels le VHB et le VHC (Marcello *et al.*, 2006; Robek *et al.*, 2005). L'IFN- λ induit une activité antivirale contre le VHC via un récepteur unique qui active la même voie de signalisation que l'IFN- α (Figure 4). Le récepteur de l'IFN- λ présente une répartition plus restreinte que le récepteur de l'IFN- α/β à la surface de différents types cellulaires. L'IFN- λ inhibe la réplication virale en activant des ISGs différents que ceux induit par l'IFN- α (Marcello *et al.*, 2006). *In vitro*, l'IFN- λ induit une augmentation constante des ISGs alors que l'IFN- α induit une forte réponse au début qui s'essouffle par la suite (Marcello *et al.*, 2006).

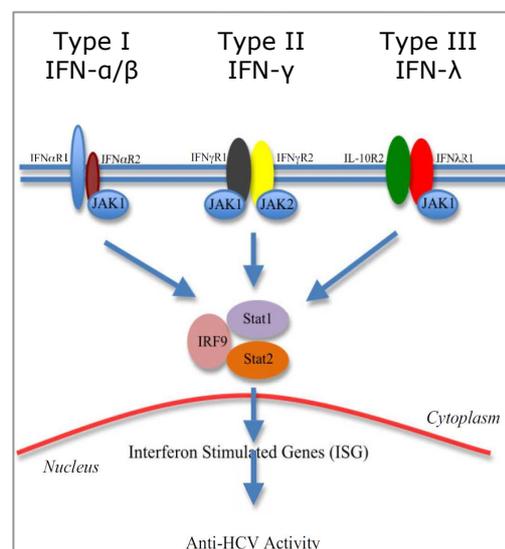


Figure 4 : Voie de signalisation de l'IFN de type I, II et III (d'après Shackel *et al.*, 2010)

Le PEG-IFN- λ est actuellement testé en monothérapie et en association avec la ribavirine dans une étude de phase I chez des patients de génotype 1 n'ayant pas répondu au traitement IFN- α . Les premiers résultats de l'essai clinique ont montré que le PEG-IFN- λ réduit la charge virale, sans induire les effets secondaires habituellement observés avec l'IFN- α (Muir *et al.*, poster n°1592 AASLD 2009).

Récemment, trois grandes études d'association génétique à grande échelle ont montré un lien entre l'absence de réponse à la bithérapie et des variations génétiques présentes dans le gène IL28B codant pour l'IFN- $\lambda 3$ (Ge *et al.*, 2009; Suppiah *et al.*, 2009; Tanaka *et al.*, 2009). Cette découverte pourrait conduire à prendre de meilleures décisions cliniques pour le traitement de l'infection chronique en fonction de l'individu.

De nombreuses études décrivent une diminution de la fréquence des mDC et des pDC périphériques chez les patients présentant une infection chronique VHC (Dolganiuc *et al.*, 2006;Kanto *et al.*, 2004;Liu *et al.*, 2009a). Cette observation peut-être la conséquence d'une migration importante des DC vers le site de l'infection, le foie. A ce jour, très peu d'études ont été réalisées sur le foie de patients infectés. Cependant, il a été montré par immunohistochimie que le nombre de mDC et pDC dans le foie des patients atteints d'une hépatite C chronique est augmenté (Nattermann *et al.*, 2006). Toutefois, il est difficile de déterminer si l'accumulation de DC dans le foie est directement liée à la diminution du nombre de DC dans le sang périphérique. Une autre possibilité est que le VHC cible les DC et réduit directement leur nombre. Il a été montré dans notre laboratoire que les protéines core, NS3 et NS5 peuvent induire l'apoptose des DC matures in vitro (Siavoshian *et al.*, 2005). De plus, chez des patients présentant une hépatite C chronique, il a été constaté que la capacité des mDC à stimuler les cellules T allogéniques est diminuée et qu'elles expriment moins de molécules de co-stimulation à leur surface (Averill *et al.*, 2007;Kanto *et al.*, 2004;Liu *et al.*, 2009a). A ce jour, les mécanismes par lesquels le VHC affecte la fonction des DC restent encore inconnus.

5.2.2. Réponse immune spécifique

Les réponses immunitaires adaptatives comprennent les réponses immunitaires humorales et cellulaires.

La réponse humorale

Le développement d'anticorps neutralisants est une marque distinctive de la clairance de nombreuses infections virales et l'induction de la production de ces anticorps grâce à la vaccination avec des sous-unités virales ou un virus inactivé est une stratégie classique pour l'induction d'une immunité protectrice. Les anticorps spécifiques anti-VHC apparaissent après la mise en place de la réponse immunitaire cellulaire et après l'élévation des ALAT (Netski *et al.*, 2005). Ils ne sont habituellement détectables dans le sérum de patients que plusieurs semaines après l'infection.

Les premiers anticorps détectables contre les antigènes du VHC dans le sérum ciblent généralement les protéines NS3 et la protéine de capsid core (Orland *et al.*, 2001). Plus tard, apparaissent les anticorps spécifiques contre la protéine NS4 et les glycoprotéines d'enveloppe (E1 et E2) (Netski *et al.*, 2005;Orland *et al.*, 2001). La région hypervariable 1 (HVR-1) de la glycoprotéine E2 du VHC est considérée comme la cible majeure des anticorps neutralisants. Des études in vivo chez le chimpanzé ont montré que les anticorps anti-VHC, spécifiques pour la région HVR-1 et ayant une capacité de neutralisation in vitro, ont des effets protecteurs contre l'infection par le VHC (NIH Consensus Statement on Management of Hepatitis C 2002;Farci *et al.*, 1994), alors que

d'autres études ont montré que des anticorps anti-HVR-1 ne sauraient conférer une immunité protectrice contre la réinfection (Bowen and Walker, 2005; Farci *et al.*, 1992).

Le fait que les patients restent infectés de façon persistante, malgré la présence de titres élevés en anticorps neutralisants, indique que les anticorps neutralisants ne sont pas efficaces. Ceci est probablement dû à la grande variabilité génique du VHC et donc à la sélection de variants qui échappent sans cesse aux anticorps.

La réponse cellulaire T

Une réponse immunitaire CD4⁺ et CD8⁺ vigoureuse contre de multiples épitopes du VHC est requise pour une clairance virale spontanée pendant la phase aiguë, mais le virus semble avoir de multiples stratégies pour échapper à ces défenses (Bowen and Walker, 2005; Ishii and Koziel, 2008).

Les cellules T CD8⁺ reconnaissent les antigènes viraux présentés par le CMH de classe I sur les cellules présentatrices d'antigène et sur les cellules cibles infectées. Leur activité antivirale comprend la cytotoxicité ainsi que la sécrétion de cytokines antivirales comme l'interféron-gamma (IFN- γ).

Dans la réponse immunitaire antivirale, les cellules T CD4⁺ ont des fonctions effectrices telles que la sécrétion de cytokines antivirales et l'activation de cellules B et T CD8⁺. De nombreuses études montrent que pendant la phase aiguë de l'infection, une réponse T CD4⁺ et CD8⁺ vigoureuse permet de limiter l'infection (Day *et al.*, 2002; Thimme *et al.*, 2001) (pour une revue voir : Ishii and Koziel, 2008; Neumann-Haefelin *et al.*, 2005). La réponse T spécifique et l'induction de l'IFN- γ coïncident avec une diminution de la virémie malgré le décalage observé entre le début de la virémie et la réponse T (Thimme *et al.*, 2001). Si la réponse T CD4⁺ est inefficace, l'infection devient persistante (Day *et al.*, 2002). Le rôle essentiel d'une réponse T CD4⁺ spécifique dans le contrôle de la virémie lors de la phase aiguë de l'infection a été rapporté dans une étude récente. Sans la réponse T CD4⁺, les cellules T CD8⁺ et les anticorps neutralisants ne parviennent pas à contrôler la virémie (Kaplan *et al.*, 2007).

Les études chez l'homme et le chimpanzé ont montré que la réponse T CD8⁺ pendant la phase aiguë de l'infection mène à la résolution de l'infection quand elle est vigoureuse et qu'elle cible de nombreux épitopes. A l'inverse, l'infection devient chronique quand la réponse T CD8⁺ est faible et cible très peu d'épitopes. En utilisant le modèle du chimpanzé, dans lequel il est possible de dépléter des populations de cellules spécifiques, des études ont montré le rôle essentiel des cellules T CD4⁺ et CD8⁺ dans l'immunité primaire protectrice (Grakoui *et al.*, 2003; Shoukry *et al.*, 2003). En effet, les cellules T CD8⁺ sont des cellules effectrices primaires mais sans l'aide des cellules T CD4⁺, les cellules T CD8⁺ ne peuvent pas suivre le rythme de la production virale et des

mutants échappant (d'échappement) à la réponse immunitaire apparaissent (Grakoui *et al.*, 2003; Shoukry *et al.*, 2003).

Les lymphocytes T CD8⁺ ont à la fois des fonctions effectrices cytolytiques et non cytolytiques. Dans le cadre d'autres virus, un mécanisme non cytolytique, c'est-à-dire une production de cytokines (IFN- γ et TNF- α), a été décrit comme un mécanisme important de la clairance virale (Guidotti and Chisari, 2001). Les mécanismes par lesquels les cellules T CD8⁺ peuvent contrôler la réplication du VHC sont encore mal connus. La plupart des chercheurs se sont concentrés sur le rôle de l'IFN- γ comme une cytokine clé, à la fois nécessaire et suffisante pour inhiber la réplication du VHC. Bien que, des données *in vitro* suggèrent que l'IFN- γ , ainsi que IFN- α/β , peuvent inhiber la réplication du VHC (Frese *et al.*, 2002). L'expression d'IFN- γ est abondante au niveau du foie, même chez les patients ayant une hépatite virale C chronique. De plus, Shin *et al.*, ont montré que l'apport d'IFN- γ directement dans le foie par un vecteur de thérapie génique n'a aucun effet sur la charge virale (Shin *et al.*, 2005). Ceci suggère que d'autres cytokines pourraient jouer un rôle dans le contrôle de la réplication du VHC.

La persistance virale semble être un mécanisme multifactoriel et le VHC a développé plusieurs stratégies pour contrer la réponse immunitaire de l'hôte.

Chez la plupart des patients, l'immunité cellulaire ne parvient pas à éradiquer l'infection par le VHC. Les réinfections par des souches VHC homologues et/ou hétérologues sont possibles chez les humains et chez les chimpanzés. Les facteurs qui semblent influencer l'évolution de l'infection par le VHC comprennent les mutations d'échappement au système immunitaire, l'influence des expériences immunitaires antérieures de l'hôte sur le répertoire des cellules T mémoire, la différenciation incomplète des effecteurs et les populations des cellules T mémoire, l'épuisement immunitaire résultant de la persistance des charges virales élevées, et les caractéristiques de l'environnement du foie qui limitent l'activation et la fonction des cellules T. Plusieurs groupes ont également montré une activation et une inhibition de la réponse immunitaire par des protéines du VHC, en particulier E2 (Rosa *et al.*, 2005) et core (Kittlesen *et al.*, 2000). En effet, les chercheurs ont proposé que la liaison E2-CD81, une tétraspanine exprimée sur la plupart des cellules, puisse modifier les fonctions des lymphocytes et des cellules NK. L'apparition de l'immunité cellulaire correspond à un pic des ALAT, ce qui suggère une réponse immunitaire transitoire associée à des lésions hépatiques (Thimme *et al.*, 2001). La résolution spontanée du VHC est associée à une réponse forte et durable des cellules T ciblant plusieurs épitopes du VHC à la fois, accompagnée d'une production intra-hépatique de l'IFN- γ (Thimme *et al.*, 2001). Mais dans le contexte d'une infection chronique il a été montré que le nombre des épitopes du VHC ciblé par les cellules T sont limités, conséquence d'un déficit de réponse immunitaire de l'hôte.

L'épuisement des cellules CD8⁺ T est une caractéristique des infections par des virus qui se répliquent rapidement (Moskophidis *et al.*, 1993) avec une charge virale élevée et persistante (Wherry *et al.*, 2003). Les cellules T CD4⁺ sont essentielles pour le maintien des réponses des cellules T CD8⁺ dans le contexte de l'infection chronique. En effet, lorsque la réponse des cellules T CD4⁺ est manquante ou perdue, l'épuisement des cellules T CD8⁺ et la persistance de l'infection sont plus susceptibles de se développer (Wherry and Ahmed, 2004).

Du à un taux de réplication estimé à 10¹² virions par jour et à une ARN polymérase ARN-dépendante n'ayant pas de fonction de correction d'erreur, plusieurs variants du virus, appelés les quasi-espèces, peuvent circuler dans un même individu. L'étude de patients et de chimpanzés chroniquement infectés par le VHC, il a été suggéré que la sélection de variants viraux échappant à la réponse des cellules T CD8⁺ pourrait faciliter la persistance de l'infection par le VHC (Chang *et al.*, 1997; Weiner *et al.*, 1995).

6. Traitements et thérapeutiques

En l'absence d'un vaccin efficace contre le VHC, le traitement actuel pour les patients atteint d'une hépatite chronique est une combinaison d'une forme stabilisée de l'IFN- α , l'IFN- α pégylé (peg-IFN- α) et un analogue nucléosidique, la ribavirine.

Le génotypage du VHC chez les patients est essentiel car en fonction du génotype du virus, la durée et la réponse au traitement peuvent varier.

En effet, cette thérapie permet de traiter environ 80% des patients infectés par un génotype 2 ou 3, et environ 50% de ceux infectés par un génotype 1. La durée du traitement est de 24 semaines quand il s'agit d'un génotype 2 ou 3, et de 48 semaines pour un génotype 1 (AASLD practise guidelines : (Ghany *et al.*, 2009).

En plus d'un taux élevé de patients non-répondeurs, ces traitements sont longs, coûteux et les effets secondaires ne sont pas négligeables : perte de poids, nausées, symptômes grippaux (fièvre, myalgies, frissons), état dépressif, désordres neuropsychiatriques, anomalies hématologiques. Le traitement est également contre-indiqué en cas de grossesse ou d'insuffisance rénale.

C'est pourquoi il est nécessaire et urgent d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et de développer de nouveaux traitements contre le VHC. Le cycle de vie du VHC offre un certain nombre de cibles potentielles pour une thérapie moléculaire ciblée. Plusieurs nouvelles thérapies antivirales sont actuellement à des stades précliniques et cliniques de développement (De and Migliaccio, 2005).

Les premières études s'intéressent surtout à améliorer le traitement actuel, car il induit de nombreux effets secondaires. C'est le cas de l'albuferon-alpha et de la viramidine qui sont en phase III. L'albuferon-alpha est un IFN- α 2b, fusionné à l'albumine, ce qui lui confère une demi-vie encore plus longue. La viramidine est un précurseur de la

ribavirine avec le même effet antiviral, mais sans l'effet hémolytique induit par le traitement avec la ribavirine.

Les inhibiteurs de la protéase NS3 permettent de bloquer la réplication virale en empêchant la maturation de la polyprotéine et la formation du complexe de réplication (CR). De plus, son inhibition permettrait d'augmenter l'efficacité de la réponse antivirale de l'hôte, car elle bloque l'activation de la réponse immunitaire innée de l'hôte. En bloquant la protéase NS3, la molécule VX-950 (telaprevir) (Vertex/Mitsubishi) est capable d'inhiber efficacement la réplication du VHC, en culture cellulaire et elle est bien tolérée chez les animaux de laboratoire. De plus, c'est la seule molécule qui est actuellement en phase 3 (Sarrazin and Zeuzem, 2010). Les résultats de la phase I des essais cliniques montrent que le VX-950 a une très forte activité antivirale (Reesink *et al.*, 2006). L'émergence de mutants résistants a également été reportée *in vitro* et *in vivo* (Kuntzen *et al.*, 2008; Reesink *et al.*, 2006; Sarrazin *et al.*, 2007). De plus les études cliniques de phase 2b ont montré récemment des résultats très encourageants en combinant le telaprevir avec l'IFN- α et la ribavirine (Hezode *et al.*, 2009; McHutchison *et al.*, 2009). Il faut cependant noter que ce traitement induit de nombreux effets secondaires et l'émergence de mutants résistants (Hezode *et al.*, 2009; McHutchison *et al.*, 2009).

Les inhibiteurs de la polymérase NS5B cible la réplication du virus. Ils sont de deux types, les analogues nucléosidiques, comme la ribavirine, et les inhibiteurs non-nucléosidiques. Les analogues nucléosidiques sont transformés en nucléotides par les cellules puis incorporés dans l'ARN viral en cours de synthèse, bloquant alors la synthèse de l'ARN. La molécule R7128, un analogue de la cytidine, montre une action antivirale très forte lors des essais cliniques (Pereira and Jacobson, 2009). Une étude récente montre, qu'après quinze jours de traitement associant le R7128 et une antiprotéase (R7227), l'ARN viral n'est plus quantifiable pour 63% des patients et est négativisé pour 25% des patients (Pereira and Jacobson, 2009). Les inhibiteurs non-nucléosidiques sont des inhibiteurs allostériques de la NS5B qui empêchent le changement de conformation de l'enzyme nécessaire à l'initiation de la synthèse d'ARN. Les différents inhibiteurs se fixent sur différents sites de la protéine, on peut donc envisager une approche thérapeutique combinée qui diminuerait le risque d'apparition de résistance. La molécule GS9190 a montré une forte activité antivirale en essai clinique de phase I (Pereira and Jacobson, 2009). Compte tenu de l'émergence précoce de mutations de résistances, ces molécules doivent être associées à la thérapie interféron-pégylée, voir à la bi-thérapie avec la ribavirine.

Il existe aussi d'autres approches, qui visent à cibler des protéines cellulaires nécessaires à la réplication, tel que des inhibiteurs de la cyclophiline, DEBIO-025 (Paeshuyse *et al.*, 2006) et MIM811 (Goto *et al.*, 2006), ou à inhiber la glycosylation des

protéines d'enveloppe et donc la morphogenèse des particules virales infectieuses, tels que des sucres-aminés qui vont se concentrer dans le réticulum endoplasmique (RE) et inhiber les α -glucosidases (celgosovir) (Durantel *et al.*, 2007). L'intérêt de ces molécules est l'absence d'émergence de virus résistants in vitro.

Les traitements immunomodulateurs sont en cours de développement mais les premiers résultats sont encourageants. Ils peuvent être utilisés pour empêcher les dommages hépatiques et/ou pour booster la réponse immunitaire de l'hôte. Ces molécules sont des agonistes des TLR. Par exemple, le SM360320, un agoniste du TLR7, réduit in vitro le taux d'ARN VHC en induisant l'expression d'IFN de type 1 (Lee *et al.*, 2006). Des molécules contenant les motifs nucléotidiques CpG (Actilion) ciblant les récepteurs TLR9 présents dans les CD sont capables de stimuler ces dernières et ainsi, d'induire une réponse immunitaire efficace (Abel *et al.*, 2005).

Un autre domaine de recherche se concentre sur le développement de vaccins thérapeutiques qui visent à stimuler la réponse immunitaire cellulaire de l'hôte contre le virus. Le développement de vaccins thérapeutiques est nécessaire, en raison de l'efficacité limitée des traitements actuels. Les protéines antigéniques du VHC, exprimées sous différentes formes (protéines seules, ADN, virus recombinant, pseudo-particules) sont utilisées pour booster la réponse immunitaire de l'hôte. Par exemple, le IC41® (Intercell, Vienne, Autriche) est un vaccin qui contient plusieurs épitopes du génome du VHC et de la polyarginine comme adjuvant. Dans un essai de phase II, le IC41® induit des réponses immunitaires importantes et des réductions transitoires des taux sériques d'ARN-VHC chez 60 patients qui n'avaient pas répondu aux thérapies standards (Klade *et al.*, 2008). Le TG4040 (Transgène, Lyon, France) est un vaccin thérapeutique à base d'un vecteur viral MVA (modified vaccinia virus Ankara) codant les protéines NS3, NS4 et NS5B. Le TG4040 stimule la réponse cellulaire T spécifique du VHC (Bain *et al.*, 2009 Nice). Les virus-like-particules ou VLPs, exprimant à leurs surfaces des glycoprotéines d'enveloppe aux propriétés antigéniques semblable à celles du virus sauvage (Baumert *et al.*, 1999), peuvent également être utilisées comme vaccins thérapeutiques (Elmowalid *et al.*, 2007).

Le développement d'un vaccin préventif afin d'éradiquer le VHC est également à l'étude. Ce vaccin doit être capable d'induire la production d'anticorps neutralisants efficace contre le VHC et de cellules T mémoires reconnaissant spécifiquement le virus. Cependant du fait de la grande variabilité génétique du virus, la construction d'un vaccin efficace contre tous les génotypes du VHC est un véritable challenge. Par exemple, l'injection de VLPs à des souris transgéniques induit une réponse humorale et cellulaire spécifique et efficace (Murata *et al.*, 2003; Qiao *et al.*, 2003). Toutefois, l'utilisation des VLPs chez les chimpanzés induit une forte réponse cellulaire T spécifique mais pas de réponse humorale (Elmowalid *et al.*, 2007).

7. Le foie, un organe cible du VHC

7.1. Populations cellulaires du foie

Le foie est l'organe le plus volumineux de l'organisme et il est composé de différents types cellulaires, ayant chacun une fonction bien définie (Figure 5).

Les hépatocytes sont les principales cellules résidentes du foie, représentant 80% des cellules hépatiques. Elles sont impliquées d'une part dans la synthèse et la sécrétion d'une grande variété de molécules biologiquement essentielles, et d'autre part dans la métabolisation et l'excrétion de substances endogènes et exogènes (Perrault and Pêcheur, 2009). Le foie joue un rôle majeur dans le métabolisme glucidique, lipidique et protéique. Le foie stabilise le taux de glucose sanguin en le stockant sous forme de glycogène (glycogénèse). Si le corps a besoin de glucose, il peut en obtenir en dégradant le glycogène (glycogénolyse) ou en transformant des substances non glucidiques telles que les acides aminés (glyconéogenèse). La plupart des protéines plasmatiques, telles que l'albumine, les facteurs de coagulation et les gammaglobulines, sont synthétisées par les hépatocytes. Le foie catabolise aussi les acides aminés en urée, qui sera éliminée dans l'urine.

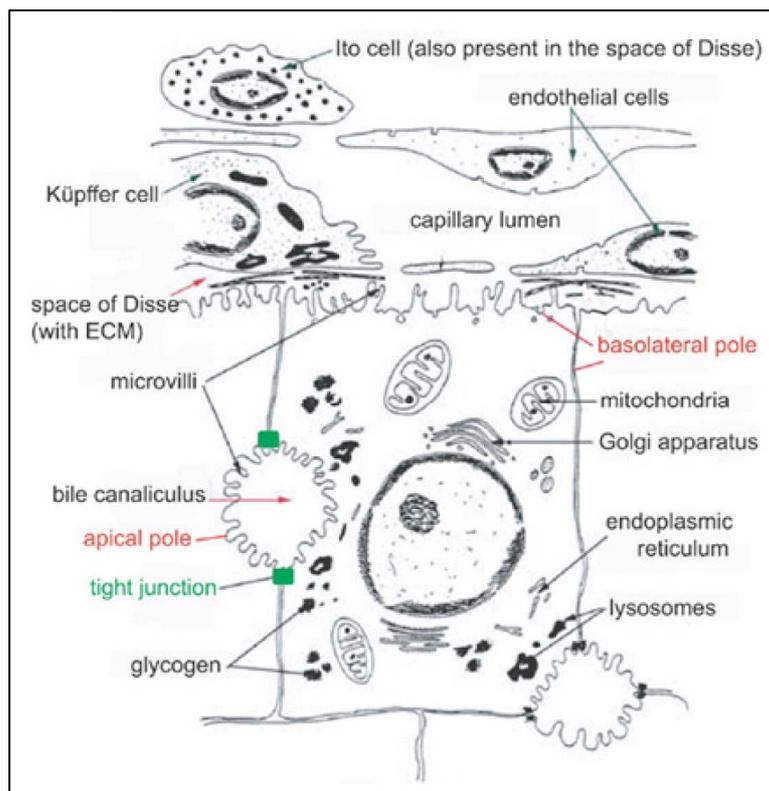


Figure 5 : Architecture du parenchyme hépatique (d'après Perrault et Pêcheur 2009)

Les hépatocytes synthétisent également du cholestérol. En effet, les cellules captent les acides gras de la circulation sanguine et les estérifient en triglycérides. Ces triglycérides formés sont liés aux cholestérols, aux phospholipides et aux apolipoprotéines, donnant ainsi naissance à une lipoprotéine qui va pouvoir rejoindre la

circulation sanguine pour être finalement stockée dans les adipocytes ou utilisée par l'organisme. Les hépatocytes participent également à la formation de la bile. Les sels biliaires sont synthétisés à partir de cholestérol et des déchets du métabolisme lipidique. La bile est très importante pour l'absorption intestinale des graisses alimentaires.

Les autres types cellulaires hépatiques sont les cellules sinusoidales. Les cellules de Kupffer, qui représente 2% de l'ensemble des cellules hépatiques. Ce sont des macrophages localisés dans la lumière des sinusoides hépatiques. Leurs principales fonctions sont la phagocytose de particules étrangères, la présentation des antigènes et la modulation de la réponse immunitaire via expression des molécules du CMH (type I et II) et de molécules de co-stimulation (Crispe, 2009).

Le foie est un organe richement vascularisé. Les cellules endothéliales du foie ne ressemblent pas aux autres endothéliums vasculaires de l'organisme. En effet, ces endothéliums n'ont pas de membrane basale et sont fenestrées, assurant ainsi aux hépatocytes un accès facile aux nutriments et aux macromolécules du sang (Perrault and Pecheur, 2009). Ces cellules représentent 6% de l'ensemble des cellules hépatiques et jouent également un rôle dans la présentation des antigènes (Crispe, 2009).

L'espace de Disse est situé entre les microvillosités de la membrane basolatérale des hépatocytes et la membrane des cellules endothéliales. Cet espace est une zone d'échange importante entre le sang circulant et les hépatocytes (Perrault and Pecheur, 2009). C'est dans cet espace que l'on trouve les cellules de Ito. Les cellules de Ito ou cellules stellaires sont riches en lipides et contiennent la vitamine A. Elles représentent 1,5% de l'ensemble des cellules hépatiques. Les cellules de Ito produisent des fibres de collagène et cette production est augmentée dans des conditions pathologiques telles la fibrose et la cirrhose (Crispe, 2009).

Les cellules à granulation sont de gros lymphocytes granuleux qui agissent comme cellules NKT (Crispe, 2009).

7.2. Métabolisme des lipoprotéines

Les lipides étant insolubles dans l'eau, leur transport dans l'organisme se fait via les lipoprotéines. Les lipoprotéines sont composées de lipides (cholestérol, triglycérides et phospholipides) et de protéines nommés les apolipoprotéines (apoB, apoE...) (Blasiole et al., 2007).

Le foie constitue l'organe central gérant le métabolisme et le transport des lipides dans l'organisme.

Il existe trois voies essentielles dans le métabolisme des lipoprotéines (Figure 6) :

1) La voie entéro-hépatique ou exogène, permettant le transport des lipides exogènes de l'intestin vers le foie.

2) La voie endogène, permettant le transport des lipoprotéines formées dans le foie vers les tissus périphériques.

3) La voie inverse ou de retour, permettant le transport du cholestérol des tissus périphériques vers le foie, où il sera en partie recyclé et en partie excrété dans la bile.

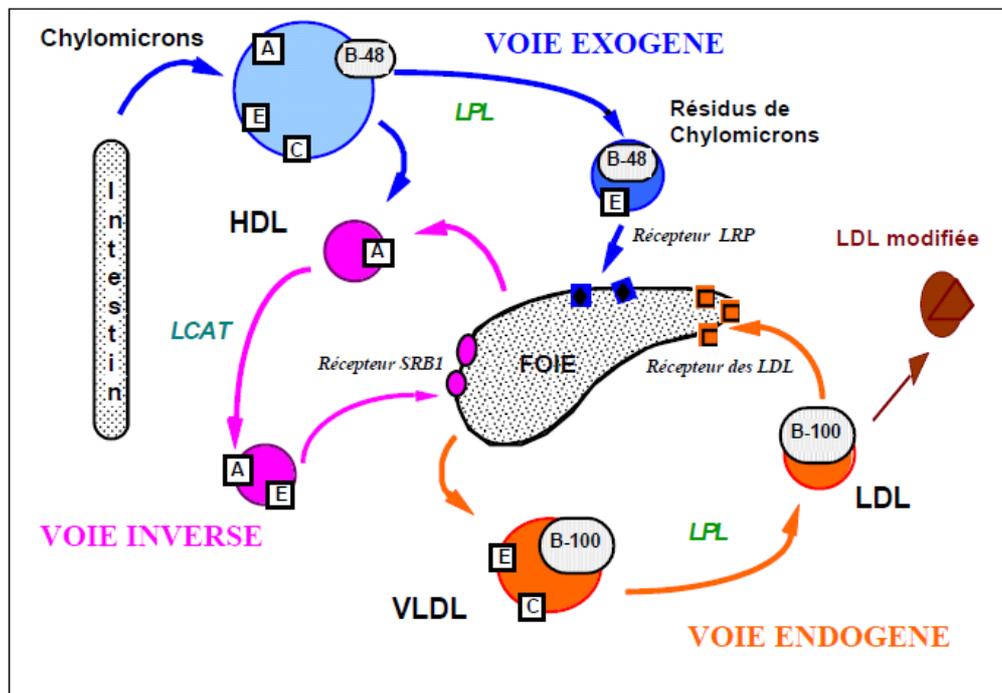


Figure 6 : Schéma du métabolisme des lipoprotéines.

La lipoprotéine lipase (LPL) est une enzyme qui permet l'hydrolyse des triglycérides des lipoprotéines plasmatiques (chylomicrons et VLDL). Elle est synthétisée par les cellules musculaires et adipeuses. La LPL intervient dans la voie exogène et endogène du métabolisme lipidique. La lécithine cholestérol acyl transférase (LCAT) est une enzyme plasmatique spécifique qui produit des esters de cholestérol formant les HDL. La LCAT intervient dans la voie inverse ou de retour.

7.2.1. Structure et fonction des lipoprotéines

Les lipoprotéines sont formées d'un cœur, contenant des lipides très hydrophobes (triglycérides TG, ester de cholestérol), entouré d'une monocouche de phospholipides où sont ancrés des cholestérols et des apolipoprotéines

Les lipoprotéines sont classées en fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques (densité, taille) (Tableau 1). Il existe une relation inverse entre la densité et la taille des lipoprotéines. En effet, les moins denses (chylomicrons et lipoprotéines de très faible densité, VLDL) sont les plus volumineuses et les plus riches en lipides. A l'inverse, les plus denses (lipoprotéines de haute densité, HDL) sont les plus petites mais aussi plus riches en protéines et appauvries en lipides.

Type de lipoprotéines	Densité (g/mL)	Taille (nm)	Composition en protéines (%)	Composition en lipides (%)	Principales apolipoprotéines
Chylomicrons	0,93	100 à 200	2	98	B48, C-II, C-III, A-I
VLDL	0,93 – 1,006	30 à 70	10	90	B100, CII, E
LDL	1,006 – 1,063	20 à 25	25	75	B100
HDL	1,063 – 1,21	8 à 20	50	50	A-I, A-II, A-III

Tableau 1 : Caractéristiques biophysiques et biochimiques des lipoprotéines.

Chaque classe de lipoprotéines a une fonction bien spécifique dans le métabolisme des lipides. Les chylomicrons transportent les triglycérides et le cholestérol alimentaire de l'intestin vers les tissus périphériques. Les VLDL, sont synthétisés par le foie pour exporter les triglycérides vers les tissus. Les lipoprotéines de faible densité, LDL, représentent une étape finale dans le catabolisme des VLDL. Les HDL sont impliqués dans le transport inverse du cholestérol.

Ces lipoprotéines ne sont pas des entités stables mais subissent des remaniements constants durant leur transit dans l'organisme. Les apoA, C et E sont échangeables alors que l'apoB constitue une armature fixe pour les chylomicrons, VLDL et LDL. Les apolipoprotéines ont aussi des fonctions spécifiques, participant au remodelage et au devenir des lipoprotéines. L'apoE est nécessaire à leur reconnaissance par les récepteurs des tissus périphériques et l'apoC-II pour l'activation de la lipoprotéine lipase (LPL).

7.2.2. Les apolipoprotéines

ApoB est une protéine de haut poids moléculaire qui va constituer une armature fixe pour les chylomicrons, les VLDL et les LDL (Blasiolo *et al.*, 2007). La protéine entière apoB100 est synthétisée au niveau du foie et entre dans la constitution des VLDL et LDL. Il existe aussi une forme tronquée de cette protéine, apoB48, qui est synthétisée au niveau de l'intestin et entre exclusivement dans la composition des chylomicrons.

ApoE, associé aux lipoprotéines, permet une réduction du cholestérol dans le plasma ainsi qu'une sortie des lipoprotéines du foie. ApoE se trouve associé aux chylomicrons, VLDL, LDL et HDL. ApoE est une protéine de 299 acides aminés et dont le poids moléculaire est d'environ 34 kDa. ApoE est synthétisée dans le foie, les macrophages et dans le cerveau. C'est une protéine antiathérogène, c'est-à-dire qu'elle empêche la formation d'athéromes qui sont des plaques de lipides se fixant à la surface interne des artères. La liaison d'apoE à la lipoprotéine se fait par la partie C terminale, au

niveau de la région 244-272. La partie N-terminale (1-191) est reconnue par les récepteurs des lipoprotéines (Mahley and Rall, Jr., 2000).

L'apolipoprotéine humaine compte trois isoformes apoE2, apoE3 et apoE4 qui se différencient par deux acides aminés Arg ou Cys en position 112 et 158 (apoE2 (Cys112, Cys158), apoE3 (Cys112, Arg158) et apoE4 (Arg112, Arg158)). L'isoforme apoE3 est la forme plus courante. Dans la population générale, la fréquence de ces allèles est de 11% (apoE2), 72% (apoE3) et 17% (apoE4). Par contre dans la population africaine, c'est la forme apoE4 qui est prédominante. L'interaction avec les lipides se fait de manière préférentielle entre apoE4-VLDL et apoE3-HDL (Dergunov *et al.*, 2008).

7.2.3. Assemblage des VLDL

Les VLDL sont assemblés et sécrétés par les hépatocytes. L'assemblage des VLDL se déroule en deux étapes. La première consiste à ajouter, de manière co-translationnelle, une lipoprotéine à l'apoB100 naissante. Cette réaction est dirigée par la MTP dans la lumière du RE (Shelness and Sellers, 2001) (Figure 7). Les apoB non associés aux lipides sont ubiquitinylées et dégradées par le protéasome (Shelness and Sellers, 2001). Cette lipoprotéine intermédiaire va être ensuite maturée, ce qui implique la fusion de l'intermédiaire avec une autre lipoprotéine (sans apoB) (Olofsson *et al.*, 2009). Le mécanisme exact et la localisation intracellulaire (RE, post-RE ou Golgi) de ces événements sont encore mal connus. L'assemblage des VLDL implique trois types de particules : une lipoprotéine primordiale, pré-VLDL (intermédiaire), une forme de VLDL pauvre en TG (VLDL2) et une forme de VLDL riche en TG (VLDL1) (Figure 7).

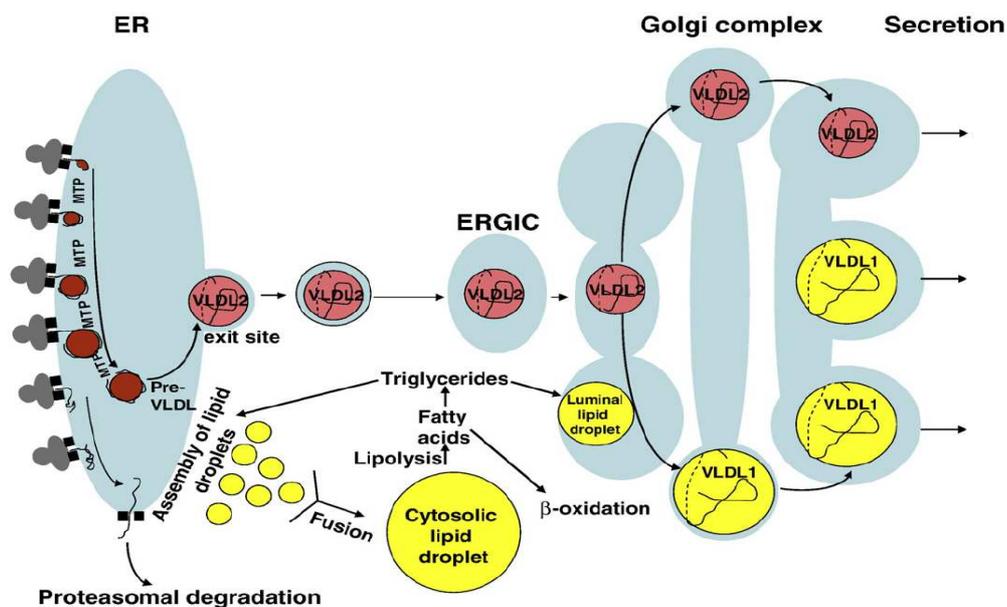


Figure 7 : Assemblage et sécrétion des VLDL (d'après Olofsson *et al.* 2009).

Les VLDL2 peuvent être secrétés ou former des VLDL1 après ajout de TG. La formation des VLDL1 se fait au niveau du Golgi et est dépendante du facteur ARF-1, protéine nécessaire au transport antérograde du compartiment ERGIC (compartiment intermédiaire entre le RE et le Golgi) au compartiment cis-Golgien, impliquant ainsi un transfert d'apoB du RE au Golgi. Le transport des VLDL du RE au Golgi a lieu dans des vésicules spécialisées dérivées du RE et est dépendant des protéines COPII (coatamer protein II) (Siddiqi, 2008). COPII est un ensemble de cinq protéines cytosoliques qui vont s'associer aux membranes des vésicules de transport et entourer cette dernière (Barlowe, 2000). La synthèse des VLDL se fait donc en deux étapes (RE et Golgi) (Olofsson *et al.*, 2009).

II. LE VIRUS DE L'HEPATITE C (VHC)

1. Classification et variabilité génomique

Le virus de l'Hépatite C est classé dans la famille des Flaviviridae. Cette famille est constituée de trois genres : le genre flavivirus (virus de la fièvre jaune, virus de la Dengue, West Nile virus), le genre pestivirus (virus de la peste porcine, virus de la diarrhée bovine) (Miller and Purcell, 1990) et le genre hepacivirus (VHC, GB virus A, B et C) (Robertson *et al.*, 1998). C'est un virus au tropisme restreint, puisqu'il infecte principalement les hépatocytes, mais peut également être retrouvé dans les cellules dendritiques et les cellules mononuclées sanguines (Navas *et al.*, 2002; Okuda *et al.*, 1999).

Le VHC est réparti en 6 génotypes (1 à 6) et en plusieurs sous-types. Les génotypes diffèrent entre eux de 30% à 35% au niveau de leurs séquences nucléotidiques (Simmonds, 2004). Dans un même génotype on distingue différents sous-types (désignés par des lettres) présentant un taux de variation de 20% en moyenne (Simmonds, 2004). Chez un même individu on retrouve également une grande hétérogénéité génétique se traduisant par l'existence de quasi-espèces (Martell *et al.*, 1992).

Les génotypes du VHC se répartissent en fonctions des zones géographiques du monde (Figure 8).

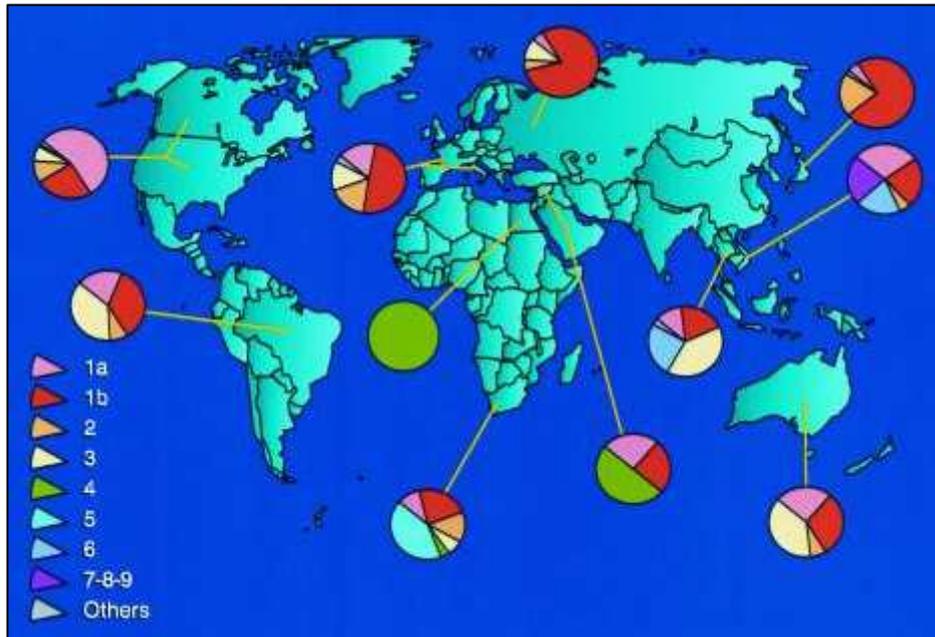


Figure 8 : Distribution géographique des différents géotypes du VHC (d'après Zein Clin Microbiol Rev. 2000).

Bien que les géotypes du VHC 1, 2 et 3 semblent avoir une distribution mondiale, leur prévalence relative varie d'une région géographique à l'autre (Figure 8). Les sous-types 1a et 1b sont les géotypes les plus courants aux États-Unis et en Europe. Bien que les sous-types 2a et 2b sont relativement fréquents en Amérique du Nord, en Europe et au Japon, le sous-type 2C se trouve communément dans le nord de l'Italie (Zein, 2000). Le géotype 4 est très répandu en Egypte et au Moyen-Orient. Les géotypes 5 et 6 semblent se limiter à l'Afrique du Sud et à l'Asie du sud-est. De plus, il existe un géotype 7, identifié dans certaines populations d'Asie (Zein, 2000).

Les géotypes se différencient également dans la réponse aux traitements et la progression de la maladie. Les patients infectés par un géotype 1 répondent moins bien au traitement par IFN que ceux infectés par le géotype 2 ou 3.

La stéatose, caractérisée par une accumulation de gouttelettes lipidiques dans les hépatocytes, est le phénotype histologique le plus important survenant chez 73% des patients infectés par le géotype 3 et chez 50% des patients infectés avec un autre géotype (Negro and Sanyal, 2009). La stéatose semble être une conséquence directe de l'expression des protéines virales dans l'infection par le géotype 3, elle est alors appelée stéatose virale alors que dans le cas d'infection par d'autres géotypes, la stéatose est associée à des syndromes métaboliques comme l'insulinorésistance et l'obésité elle est alors appelée stéatose métabolique (Negro and Sanyal, 2009). En effet, la protéine de capsid core, principalement celle du géotype 3, semble jouer un rôle majeur dans la stéatose virale (Rubbia-Brandt *et al.*, 2000).

L'infection par le VHC est un processus très dynamique avec un temps de demi-vie des hépatocytes infectés de quelques heures et une production de 10^{12} virions par jour et par individu. Cette grande capacité répliquative et une fréquence d'erreur importante (10^{-3} à 10^{-4} par position nucléotidique) en font un virus à haute variabilité génétique.

2. Propriétés biophysiques de la particule virale

Le VHC est un virus enveloppé sphérique de 55-65 nm de diamètre (Kaito *et al.*, 1994). Il est constitué d'une nucléocapside de 30-35 nm de diamètre (Andre *et al.*, 2002) et entouré d'une enveloppe dans laquelle sont ancrées les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 (Figure 9).

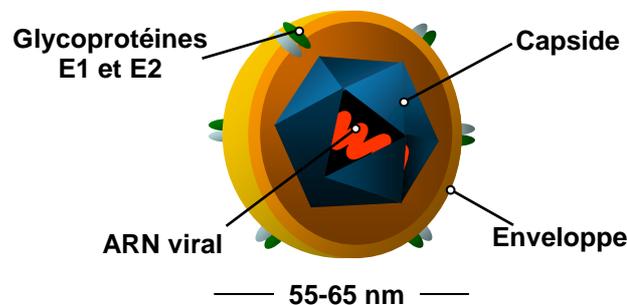


Figure 9 : Représentation schématique du VHC.

De nombreuses études ont montré que le VHC circule dans le sang des patients infectés sous différentes formes. Il est associé aux lipoprotéines et présente une distribution hétérogène en gradient de densité. Il existe des particules de faible densité (1,03 à 1,08 g/mL) et de haute densité (1,17 à 1,25 g/mL) (Andre *et al.*, 2002). Les particules de faible densité, associées aux VLDL ou LDL, sont plus infectieuses que celle de plus haute densité associée à des IgG (Andre *et al.*, 2002; Bradley *et al.*, 1991; Hijikata *et al.*, 1993). Les particules infectieuses de faible densité sont appelées des lipo-viro-particules (LVP) (Andre *et al.*, 2002). Elles contiennent, en plus de l'ARN VHC, des protéines de capsid et des glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2, des apoB et apoE.

Récemment, il a été montré que la production de VHC par des cellules hépatocytaires dépend de l'assemblage et de la sécrétion des VLDL, suggérant que les particules du VHC seraient liées aux VLDL durant leur assemblage et sécrétées avec elles (Gastaminza *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2007a). Icard *et al.*, ont montré que, même en l'absence de virus, les glycoprotéines E1 et E2 étaient sécrétées associées à apoB dans des cellules Caco-2 en culture (Icard *et al.*, 2009).

3. Organisation du génome

Le génome du VHC est constitué d'un ARN simple brin de polarité positive de 9,6kb (Choo *et al.*, 1989) avec un cadre ouvert de lecture (ORF) flanqué de région non traduite 5' et 3' (Figure 10). Une des caractéristiques intéressantes du génome du VHC est son degré élevé de variabilité génétique. Cependant les taux de mutation diffèrent en fonction des régions génomiques. Les régions E1 et E2 sont les régions les plus variables, alors que les extrémités 5' et 3' NTR sont très conservées parmi les génotypes.

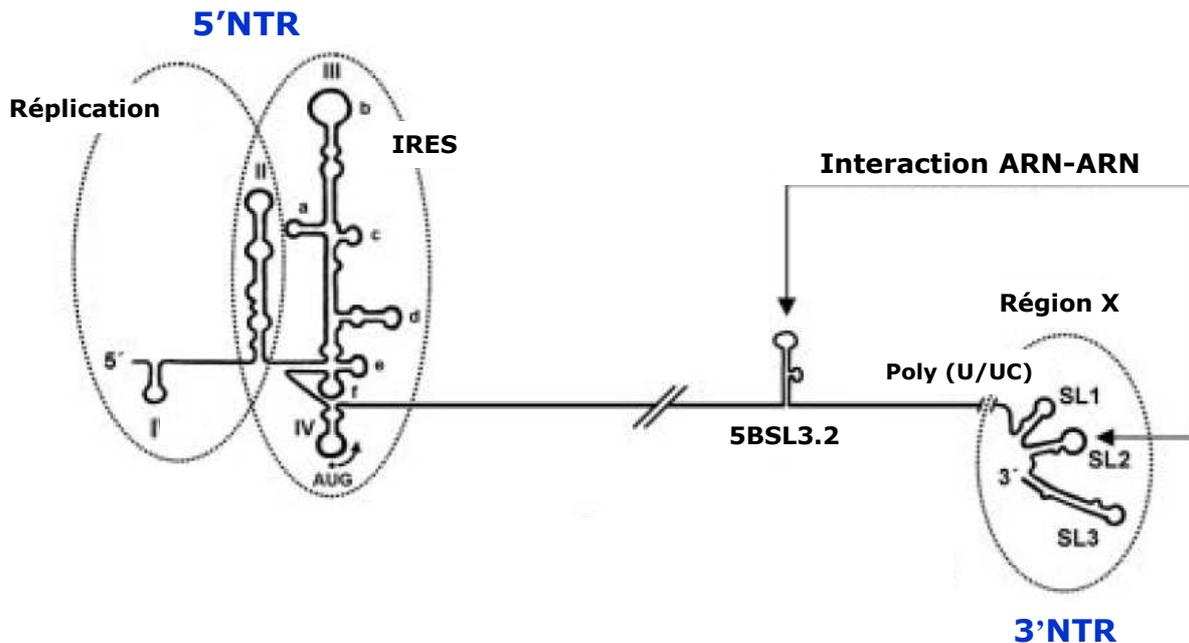


Figure 10 : Structures secondaires des régions 5' et 3' NTR du VHC (d'après Appel et al. 2006)

3.1. Régions non traduites

3.1.1. La région 5' non traduite (5'NTR)

La 5'NTR assure la traduction de l'ORF en une polyprotéine de 3010 acides aminés. C'est une région de 341 nucléotides, très conservée et très structurée. La 5'NTR forme une structure secondaire comprenant quatre grands domaines structuraux distincts, I à IV. Les domaines II à IV ainsi que le début de la séquence ORF constituent le site interne d'entrée du ribosome (IRES) (Figure 10).

Par analogie avec d'autres virus à ARN utilisant un IRES, il a été suggéré que la région 5'NTR ne contient pas seulement les facteurs déterminants pour la traduction, mais aussi des éléments pour la réplication de l'ARN (Astier-Gin *et al.*, 2005). En effet, il semblerait que (1) la séquence en amont de l'IRES est essentielle pour la réplication de l'ARN viral (Friebe *et al.*, 2001), (2) des séquences dans l'IRES sont nécessaires à la

réplication efficace du VHC (Friebe *et al.*, 2001) et (3) la tige-boucle du domaine II de l'IRES est cruciale pour la réplication (Appel and Bartenschlager, 2006).

Des études récentes ont révélées qu'un micro-ARN (miR-122), spécifiquement exprimé dans les hépatocytes, facilite la réplication de l'ARN du VHC en interagissant avec la région 5'NTR en culture cellulaire (Jopling *et al.*, 2005). Cet effet n'a toutefois pas été confirmé *in vivo* (Sarasin-Filipowicz *et al.*, 2009).

3.1.2. La région 3' non traduite (3'NTR)

La région 3'NTR, de taille variable selon les génotypes, contient trois domaines distincts : une région peu conservée de 40 à 250 nucléotides, une séquence interne poly-uracile/pyrimidine (poly(U/UC)) de longueur variable (20 à 200 nucléotides) et une séquence de 98 nucléotides, appelée la région X. Cette région très conservée et très structurée, comprenant trois tiges boucles stables SL1, 2 et 3, joue un rôle important dans l'initiation de la synthèse du brin ARN (-) au cours de la réplication (Figure 10) (Kolykhalov *et al.*, 1996).

Il existe aussi en amont de la région 3'NTR, dans la séquence codant la protéine NS5B, une structure tige boucle, appelé 5BSL3.2, qui interagit avec la boucle SL2 de la région 3'NTR (Figure 10). Cette interaction est essentielle à la réplication de l'ARN virale (Friebe *et al.*, 2005; You *et al.*, 2004).

3.2. Les protéines virales

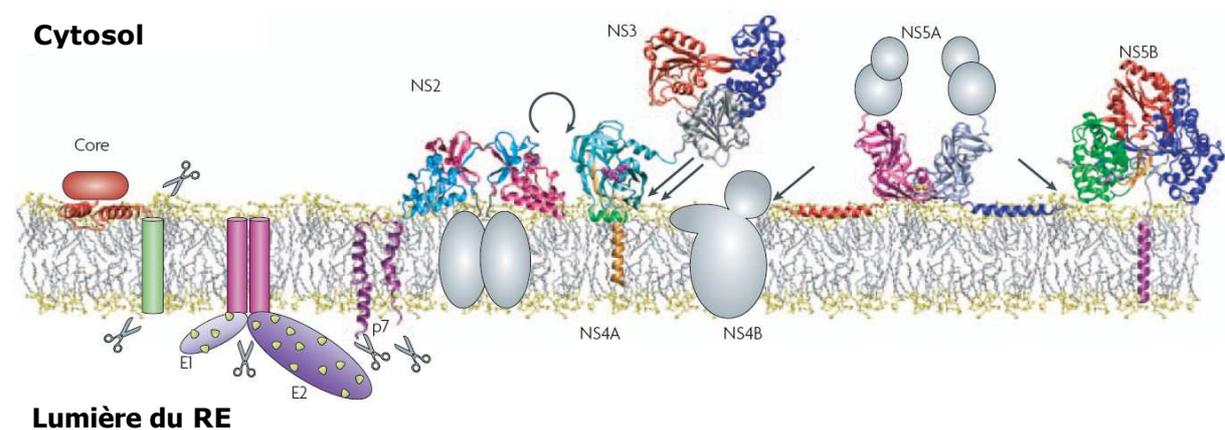


Figure 11 : Les protéines du VHC et leur association avec la membrane du RE (d'après Moradpour *et al.* Nature Reviews Microbiology 2007).

Le génome du VHC code une polyprotéine de 3010 acides aminés, synthétisée au niveau du RE et maturée en 10 protéines ancrées ou apposées à la membrane du RE (Figure 11). Ces protéines sont classées en deux groupes, les protéines structurales core, E1, E2 forment les particules virales et les protéines non structurales NS2, NS3, NS4A,

NS4B, NS5A et NS5B sont impliquées dans la maturation, la réplication et l'assemblage des virions. La protéine p7 est une viroporine jouant un rôle dans l'infectivité du virus (Steinmann *et al.*, 2007). De plus, il a été décrit qu'un cadre de lecture chevauchant celui de la polyprotéine au niveau de la séquence de la protéine core code une onzième protéine, la protéine ARFP.

3.2.1. La protéine core

La protéine core, qui va former la capsid du virus, est la première protéine codée par le génome du VHC. Elle est clivée, au niveau de la jonction core-E1, par une signal peptidase (SP) cellulaire en une forme immature de 23kDa. Puis, la maturation se poursuit par le clivage du signal peptide, contenu dans sa partie C-terminale. Le clivage se fait par la signal-peptide peptidase (SPP) cellulaire, produisant une protéine de 21kDa (Figure 12) (McLauchlan *et al.*, 2002). La maturation de la protéine core par la SPP est nécessaire à la formation des particules virales infectieuses (Targett-Adams *et al.*, 2008).

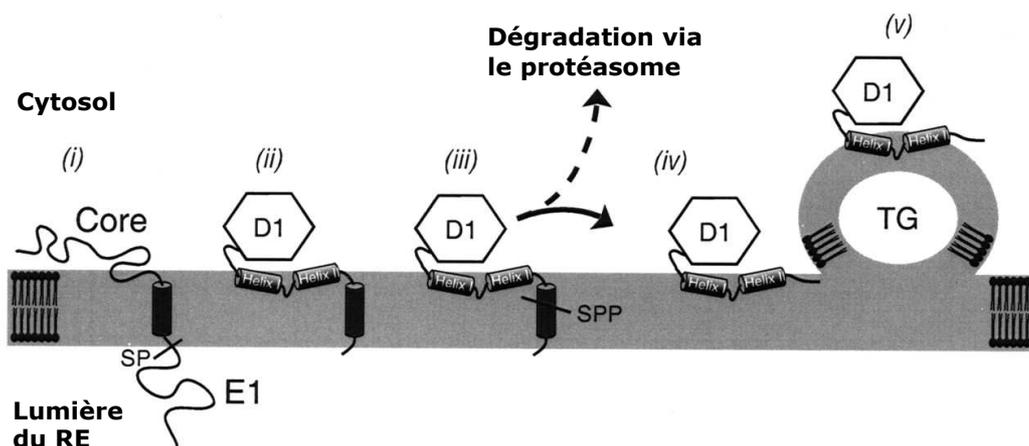


Figure 12 : Modèle de la conformation de la protéine core et de sa localisation aux gouttelettes lipidiques (d'après Boulant *et al.* 2006).

La protéine core mature contient deux domaines. Le domaine 1, riche en acides aminés basiques, est impliqué dans la liaison avec la région 5'NTR de l'ARN du VHC, permettant la formation de la nucléocapside. La protéine core se localise sur la membrane du RE et sur les gouttelettes lipidiques (McLauchlan *et al.*, 2002). Le domaine 2, riche en acides aminés hydrophobes, assure cette localisation mais aussi le bon repliement et la stabilité de celle-ci (Boulant *et al.*, 2006). L'introduction de mutations dans le domaine 2 perturbe la distribution de core, qui n'est plus associée aux gouttelettes lipidiques, ce qui a pour conséquence une baisse de la production de particules infectieuses (Boulant *et al.*, 2007). La protéine core joue également un rôle important dans le recrutement des protéines non-structurales et des CR au niveau des

gouttelettes lipidiques (Miyanari *et al.*, 2007). De plus, il a été récemment rapporté que la protéine core interagit directement avec la tubuline, ce qui renforcerait la polymérisation des microtubules, afin de promouvoir le transport du virus et/ou l'assemblage du virus dans les cellules infectées (Roohvand *et al.*, 2009). Ces observations suggèrent que l'association de core aux gouttelettes lipidiques est essentielle pour la morphogénèse du virion.

La protéine core pourrait intervenir dans la régulation de l'expression de certains gènes cellulaires impliqués dans l'apoptose, le métabolisme lipidique et la prolifération cellulaire. En effet, core possède un pouvoir transformant conduisant à la formation de tumeurs quand elle est exprimée dans des souris transgéniques (Ray *et al.*, 1996). Cependant certaines de ces fonctions sont encore controversées. La protéine core stimule la lipogénèse en activant les facteurs de transcription RxRa (retinoïd x receptor α), SREBP (sterol regulatory element binding proteins) et FAS (fatty acid synthase) (Syed *et al.*, 2009). Core interagit directement avec les facteurs RxRa et SREBP (Roingard and Hourieux, 2008). D'un autre côté, core diminue l'expression du facteur nucléaire PPAR α (peroxisome proliferator-activated receptor α) qui régule de nombreux gènes impliqués dans la dégradation des acides gras. De plus, il a été montré que chez des souris transgéniques exprimant la protéine core l'activité de la MTP (microsomal triglyceride transfer protein) est réduite, ce qui induit une réduction de l'assemblage et de la sécrétion des VLDL (Perlemuter *et al.*, 2002). Cependant, aucune interaction directe entre ces deux protéines n'a été montrée, suggérant une action indirecte de core sur l'activité de la MTP. La protéine core semble également s'accumuler dans les mitochondries, d'où elle induirait des dommages hépatiques, en produisant des radicaux libres ou ROS (reactive oxygen species) (Okuda *et al.*, 2002).

3.2.2. La protéine ARFP

En plus du cadre ouvert de lecture de la polyprotéine, des analyses de séquences ont montré l'existence d'un cadre de lecture alternatif (ARF) chevauchant avec la séquence codant pour la protéine core dans le cadre +1 (Walewski *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2001). Ce cadre alternatif code une petite protéine de 17kDa, appelée ARFP (Alternate Frame Reading Protein) (Varaklioti *et al.*, 2002). La séquence codant l'ARFP est conservée dans différents génotypes du VHC quoique sa longueur varie en fonction du génotype (Xu *et al.*, 2001). Après la traduction, cette protéine se localise dans le RE et sa demi-vie est estimée à dix minutes, car elle est dégradée par le protéasome (Xu *et al.*, 2003). L'expression d'une forme tronquée de la protéine ARFP (8KDa) est inversement proportionnelle à la synthèse de la protéine de capsid core, ce qui pourrait expliquer le faible taux d'expression de cette protéine durant l'infection virale (Wolf *et al.*, 2008). L'abolition de la production de la protéine ARFP n'a aucun effet sur la réplication du VHC

en culture cellulaire ou chez des souris uPA-SCID, suggérant que cette protéine n'est probablement pas importante lors des phases précoces de l'infection virale. Certains patients présentent des anticorps anti-ARFP et une réponse immunitaire anti-ARFP, suggérant que cette protéine est produite in vivo (Bain *et al.*, 2004; Komurian-Pradel *et al.*, 2004). De plus la protéine ARFP module le taux de cytokines (Fiorucci *et al.*, 2007). Cependant, la fonction de l'ARFP est actuellement inconnue.

3.2.3. Les protéines E1 et E2

Décrites dans le chapitre entrée du cycle viral (page 51).

3.2.4. La protéine p7

La protéine p7 est constituée de 63 acides aminés (acides aminés 747 à 809) et possède deux domaines transmembranaires connectés par une petite boucle riche en acides aminés basiques dirigée vers le cytoplasme et deux extrémités N- et C-terminales dirigées vers la lumière du RE (Carrere-Kremer *et al.*, 2002) (Figure 11).

Il a été décrit que cette protéine forme un oligomère possédant toutes les caractéristiques d'un canal ionique (Carrere-Kremer *et al.*, 2002). La protéine p7 est essentielle à l'infection du VHC chez les chimpanzés (Sakai *et al.*, 2003) et elle agit à une étape précoce de la morphogénèse des particules infectieuses (Jones *et al.*, 2007). L'association de la p7 au RE semble également être importante pour l'assemblage et la sécrétion de particules virales infectieuses du VHC (Steinmann *et al.*, 2007).

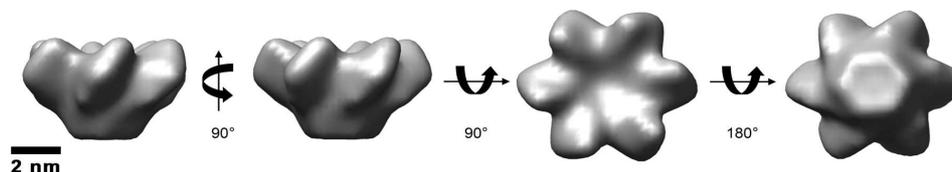


Figure 13 : Structure 3D du canal p7 (d'après Luik *et al.* 2009).

Trois protéines p7 s'assemblent en hexamère, formant un canal ionique. Les six protubérances ou pétales de fleur forment le haut du canal, orienté vers la lumière du RE et la base forme le canal.

Récemment, en utilisant un microscope électronique à haute résolution (16Å) (single-particle electron microscopy) Luik *et al.*, ont décrit pour la première fois la structure 3D de cette viroporine (Luik *et al.*, 2009) (Figure 13). Les protéines s'assemblent pour former un hexamère de 42kDa avec une architecture en pétale de fleur orientée vers la lumière du RE. La partie la plus large du canal présente une zone relativement grande offrant des sites potentiels pour l'interaction avec des protéines cellulaires ou virales présentes dans la membrane du RE (Luik *et al.*, 2009).

3.2.5. La protéine NS2

La protéine NS2 (acides aminés 810 à 1026) est une protéine transmembranaire (Figure 11), de 21-23kDa, non essentielle à la formation du complexe de réplication (Blight *et al.*, 2000; Lohmann *et al.*, 1999), mais elle est impliquée dans la formation de particules virales infectieuses, suggérant que cette protéine pourrait agir dans la morphogénèse du VHC (Jones *et al.*, 2007).

NS2 forme avec le tiers de la partie N-terminale de NS3 une protéase, qui assure le clivage entre la jonction NS2-NS3. Cette activité protéasique est dépendante de l'ion zinc. L'analyse cristallographique du domaine catalytique de NS2 a révélé une protéase à cystéines dimérique avec deux sites actifs (Figure 14). Pour chaque site catalytique, les résidus His143 et Glu13 d'un monomère et le résidu Cys184 de l'autre monomère constituent le site actif de la protéase NS2 (Lorenz *et al.*, 2006). Après clivage de la jonction NS2-NS3, les extrémités C-terminales du dimère s'éloignent et l'activité protéasique est perdue.

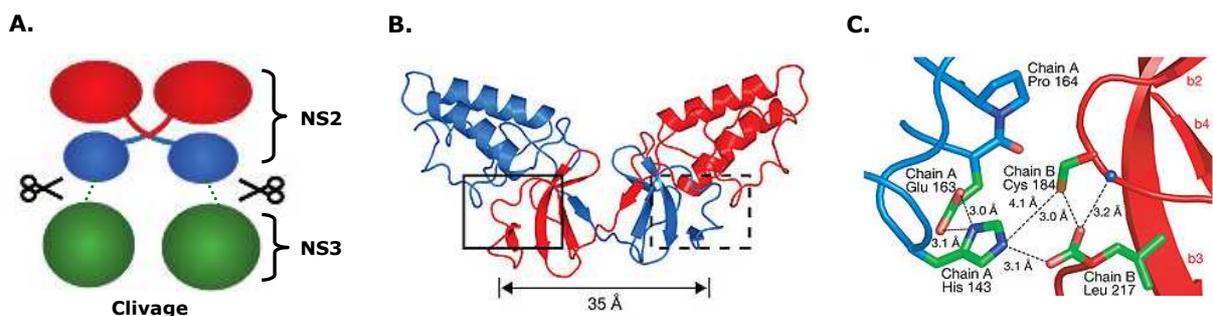


Figure 14 : Structure du domaine NS2 catalytique après clivage par la protéase NS2/3 (d'après Lorenz *et al.* 2006).

(A) Modèle d'action de la protéase NS2/3 (B) NS2 forme un dimère : un monomère est représenté en bleu et l'autre en rouge. (C) Site actif de la protéase avant le clivage, le clivage nécessite le rapprochement des extrémités C-terminales des deux monomères.

La partie N-terminale de NS2 a d'abord été suggérée comme impliquée dans l'infectivité du VHC (Pietschmann *et al.*, 2006). Par la suite, il a été montré que la première région transmembranaire de NS2 est importante pour la production de virions infectieux. Plusieurs résidus sont impliqués mais tout particulièrement un résidu glycine (Gly 10), en position centrale de la première région transmembranaire, est essentiel à l'assemblage des particules du VHC (Jirasko *et al.*, 2008). De plus, le domaine protéasique de NS2, mais pas son activité catalytique, est essentiel à la formation de particules infectieuses (Jirasko *et al.*, 2008; Lorenz *et al.*, 2006). Très récemment, Dentzer *et al.*, ont montré que la mutation des résidus à l'interface du dimère ou dans la région C-terminale n'a pas d'incidence sur la réplication, la stabilité de NS2, ou l'activité de la protéase NS2, mais diminue la production de virus infectieux (Dentzer *et al.*, 2009).

Le Leu217 du domaine C-terminal semble très important pour la production de particules infectieuses (Dentzer *et al.*, 2009).

3.2.6. La protéine NS3-NS4A

La protéine NS3 (acides aminés 1027 à 1657) est une protéine multifonctionnelle (Figure 11).

La partie N-terminale est, en association avec la protéine NS4A (acides aminés 1658 à 1711), une sérine protéase, responsable des clivages en aval de NS3 (Bartenschlager *et al.*, 2004). La triade catalytique est formée des résidus, His(57)1083, Asp(81)1107 et Ser(139)1165. La protéine NS4A est nécessaire à la fois, à la stabilisation de la protéine NS3 et grâce à sa partie N-terminale hydrophobe et à l'ancrage du complexe NS3/4A à la membrane du RE (Wolk *et al.*, 2000). La sérine protéase NS3/4A possède une poche dans laquelle se loge le substrat. Cette poche, particulièrement peu profonde, rend le développement d'inhibiteurs efficaces et spécifiques difficile (Bartenschlager *et al.*, 2004).

La partie C-terminale de la protéine NS3 possède une activité hélicase et NTPase (Tai *et al.*, 1996). Les enzymes de cette superfamille sont capables, en présence d'ATP, de séparer des duplexes ARN-ARN. Bien que la forme monomérique de NS3 soit capable de se lier à l'ARN, le déroulement de l'ARN requiert un dimère de NS3 (Serebrov and Pyle, 2004). L'activité hélicase est nécessaire à la réplication de l'ARN. Il est possible qu'elle agisse lors de l'initiation de la réplication de l'ARN VHC, en déroulant les structures secondaires des brins (+) et (-) du génome viral. Elle pourrait également contribuer à la processivité du complexe de réplication en éliminant les structures secondaires internes et/ou en déplaçant les protéines liées à l'ARN. Il a d'ailleurs été décrit que NS3 peut interagir avec certaines protéines cellulaires (les kinases PKA et PKC et l'oncogène p53) (Tellinghuisen and Rice, 2002) mais aussi avec NS5B, ce qui a pour effet de moduler l'activité hélicase de NS3 (Jennings *et al.*, 2008). La NS3 pourrait également servir à dissocier la forme répliquative de l'ARN. Enfin, NS3 serait également impliquée dans l'assemblage de particules infectieuses (Ma *et al.*, 2008).

Par ailleurs, la protéase NS3/4 est impliquée dans l'inhibition de la réponse IFN dans les cellules infectées. En effet, la protéase clive deux protéines adaptatrices, TRIF et Cardif, impliquées dans la voie de signalisation de l'IFN (Gale, Jr. and Foy, 2005).

3.2.7. La protéine NS4B

La protéine NS4B (acides aminés 1712 à 1972) est une protéine hydrophobe, de 27kDa, intégralement associée aux membranes du RE (Hugle *et al.*, 2001) (Figure 11). NS4B induit la formation d'un compartiment membranaire spécialisé, dérivé des membranes du RE, appelé le "membranous web", siège de la réplication de l'ARN viral

(Egger *et al.*, 2002). La NS4B contient au moins quatre domaines transmembranaires. Les domaines N- et C-terminal sont orientés vers le cytosol. Néanmoins, une fraction de l'extrémité N-terminale est détectée dans la lumière du RE. Cette extrémité N-terminale semble responsable de la formation du "membranous web" (Lundin *et al.*, 2006). Les parties N- et C-terminales sont également importantes pour la formation d'un complexe de réplication fonctionnel (Gouttenoire *et al.*, 2009b;Gouttenoire *et al.*, 2009a). De plus, la palmitoylation de deux cystéines présentes à l'extrémité C-terminale de NS4B semble importante pour la formation du complexe de réplication et pour la formation d'un oligomère (Yu *et al.*, 2006). Il semblerait aussi que l'oligomérisation de NS4B soit requise pour l'induction du réseau membranaire et l'assemblage d'un CR fonctionnel (Gouttenoire *et al.* présentation congrès International HCV, Nice 2009).

3.2.8. La protéine NS5A

NS5A (acides aminés 1973 à 2420) est une phosphoprotéine (56–58 kDa) ancrée dans la membrane du RE, grâce à son extrémité N-terminale qui est repliée en une hélice α amphiphile (H1) (Figure 15) (Brass *et al.*, 2002;Penin *et al.*, 2004). Cette hélice α pourrait servir de plate-forme, impliquée dans des interactions protéine-protéine nécessaires à l'assemblage d'un CR fonctionnel (Penin *et al.*, 2004).

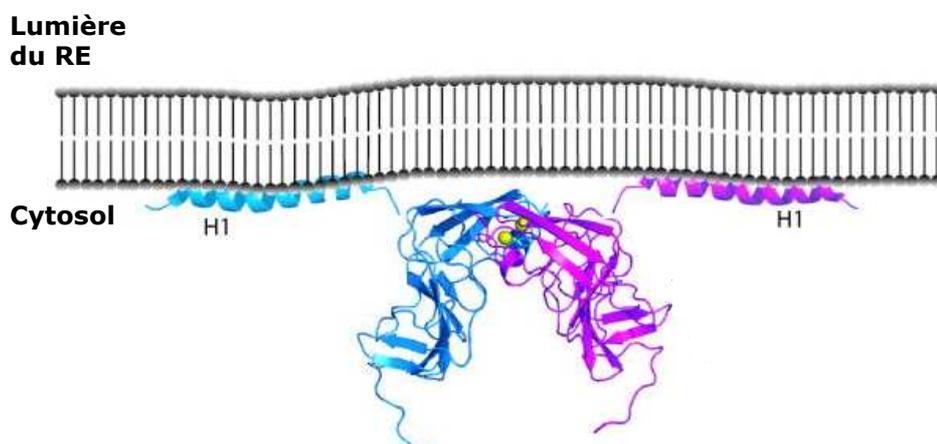


Figure 15 : Modèle de la conformation de la protéine NS5A à la membrane du RE (d'après Tellinghuisen *et al.* 2005).

La protéine NS5A est composée de trois domaines distincts I, II et III, séparés par des séquences de moindre complexité (LCSI et II) (Figure 15) (Tellinghuisen *et al.*, 2004). Le domaine I permet la fixation de l'ARN (Tellinghuisen *et al.*, 2005). Il comporte un sous-domaine N-terminal IA exclusivement basique et un sous-domaine C-terminal IB majoritairement acide (Tellinghuisen *et al.*, 2005). Le sous-domaine IA contient quatre résidus cystéines qui fixent un ion zinc dont la mutation abolit la réplication. Le sous-domaine IB contient deux résidus cystéines liés par un pont disulfure, qui ne paraît pas

essentiel pour la réplication. Le domaine I forme des homodimères, par une interaction au voisinage des extrémités N-terminales, formant un sillon basique localisé sur la membrane, qui est le site d'ancrage de l'ARN. La protéine NS5A interagit avec l'ARN viral avec une haute affinité pour la partie riche en pyrimidines de l'extrémité non traduite du brin (+) (Huang *et al.*, 2005).

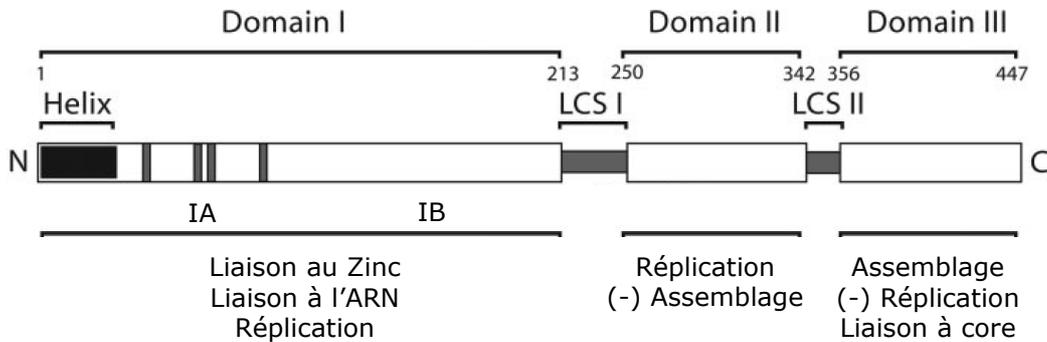


Figure 16 : Représentation schématique de la protéine NS5A (d'après Tellinghuisen *et al.* 2008).

Les quatre résidus cystéine correspondant au site de coordination de l'ion zinc sont indiqués par des barres grises dans le domaine I de la protéine.

Le domaine II est impliqué dans l'inhibition de la protéine kinase PKR, activée par l'IFN en réponse à la présence d'ARN double brin dans la cellule (Gale, Jr. *et al.*, 1998). De plus, il a été récemment montré que NS5A bloque la voie de signalisation de l'IFN en inhibant la phosphorylation de STAT1, impliqué dans l'activation des ISG (Lan *et al.*, 2007). Le domaine II est également important pour la réplication de l'ARN du VHC (Tellinghuisen *et al.*, 2008b).

Le domaine III est peu conservé entre les génotypes et n'est pas nécessaire à la réplication (Appel *et al.*, 2005b). Ce domaine a notamment été utilisé pour insérer des gènes rapporteurs tels que la GFP lors de la construction de réplicons subgénomiques (Appel *et al.*, 2005b; Moradpour *et al.*, 2004).

Des études récentes ont montré l'importance de la protéine NS5A dans l'assemblage des virions. Le domaine I de la protéine NS5A est important pour la localisation de NS5A au niveau des gouttelettes lipidiques par son interaction avec core (Miyinari *et al.*, 2007). Le domaine III est important pour l'assemblage et la production de particules virales infectieuses (Appel *et al.*, 2008). En effet, la délétion du domaine III induit une délocalisation de la protéine NS5A, elle n'est plus associée à la protéine core, qui s'accumule autour des gouttelettes lipidiques (Appel *et al.*, 2008).

Les données actuelles indiquent que NS5A pourrait fonctionner comme un interrupteur moléculaire entre la réplication et l'assemblage. En effet, l'état de phosphorylation de cette protéine affecte la réplication de l'ARN VHC et il existe une

corrélation inverse entre les mutations adaptatives NS5A facilitant la réplication et la production de virus (Appel *et al.*, 2005b;Evans *et al.*, 2004;Tellinghuisen *et al.*, 2008a). Tellinghuisen *et al.*, ont récemment identifié un résidu essentiel, la Ser457, phosphorylée par une kinase cellulaire, la caséine kinase II (CKII), ce qui a pour effet de réguler la production de nouvelles particules infectieuses (Tellinghuisen *et al.*, 2008a).

La protéine humaine VAP-A (vesicle-associated membrane protein-associated protein A) dont l'interaction avec NS5A est nécessaire pour la réplication, est régulée par la phosphorylation de NS5A (Evans *et al.*, 2004). En effet, l'hyperphosphorylation de NS5A bloque l'interaction avec VAP-A et limite donc la réplication virale. VAP-A est trouvée dans les membranes du RE et de l'appareil de Golgi et intervient dans la mobilité intracellulaire des vésicules, mais il reste à déterminer pourquoi cette protéine est détournée par NS5A à certaines étapes du cycle viral. Un autre interactant cellulaire de NS5A est la protéine FBL-2 géranylgéranylée dont l'inhibition par siARN réduit considérablement la réplication de l'ARN viral (Wang *et al.*, 2005;Ye *et al.*, 2003).

En culture cellulaire, la protéine NS5A non fonctionnelle peut-être trans-complémentée par une protéine NS5A fonctionnelle suggérant que NS5A joue en plus un rôle en dehors du CR (Appel *et al.*, 2005a). En effet, NS5A interagit avec des protéines cellulaires impliquées dans de nombreuses voies de signalisation, suggérant que NS5A peut modifier son environnement cellulaire pour le rendre plus favorable au virus (Macdonald and Harris, 2004).

3.2.9. La protéine NS5B

NS5B (acides aminés 2421 à 3011) est l'ARN polymérase ARN-dépendante du virus. Elle possède le motif Gly-Asp-Asp (GDD) et une structure 3D en main droite, caractéristique des polymérases (Bressanelli *et al.*, 1999;Poch *et al.*, 1989). Le site catalytique, représenté par la paume de la main, est surplombé des domaines pouce et doigts qui forment un tunnel par lequel l'ARN simple brin est directement amené au site actif (Bressanelli *et al.*, 2002). Un autre tunnel, chargé positivement, permet l'entrée des nucléotides, nécessaires à l'élongation de l'ARN viral, au niveau du site actif. Il est communément admis que la liaison de l'ARN matrice et l'initiation de la synthèse sont régulées par une tige-boucle beta très flexible localisée dans le sous-domaine pouce et pointant vers le site actif (Hong *et al.*, 2001). Comme d'autres polymérases virales, la NS5B est une cible de choix pour le développement de nouvelles molécules antivirales contre le VHC (De and Migliaccio, 2005).

NS5B est ancrée dans la membrane du RE par son domaine transmembranaire C-terminal (Figure 11) (Ivashkina *et al.*, 2002). L'association de la NS5B à la membrane du RE est indispensable à la réplication du VHC (Moradpour *et al.*, 2004).

L'activité de la NS5B est modulée par des interactions avec les protéines virales NS3 et NS5A (Bartenschlager *et al.*, 2004). La cyclophiline B, un peptidyl-propyl cis-trans-isomérase, améliore l'affinité pour l'ARN de la NS5B, en interagissant avec sa partie C-terminale et stimule la réplication virale (Watashi *et al.*, 2005). Cependant le rôle de la cyclophiline B reste encore controversé. La cyclosporine A et le DEBIO-025, un analogue de cette dernière, sont des inhibiteurs des cyclophilines et ils inhibent la réplication du VHC en culture cellulaire (Kaul *et al.*, 2009; Watashi *et al.*, 2003).

III. LES MODELES D'ETUDES

La découverte du VHC par des techniques de biologie moléculaire a permis l'étude biochimique des protéines codées par le génome viral, mais en l'absence d'un modèle cellulaire robuste et d'un modèle animal de petite taille permettant la production de particules virales infectieuses, l'étude complète du cycle viral du VHC était impossible. Cependant, de nombreux modèles permettant l'étude certaines étapes du cycle viral (entrée, réplication, traduction) ont été développées ces dix dernières années. En 2005, un modèle de culture cellulaire du VHC (VHCcc) a été mis en place permettant la production de virions infectieux en culture cellulaire et ouvrant ainsi de nouvelles perspectives sur l'étude du cycle viral du VHC. Ce système est basé sur l'utilisation d'un génome viral particulier le génome JFH-1 (JFH-1, pour japanese Fulminant hepatitis 1).

1. Les modèles animaux

1.1. Le chimpanzé

Pendant longtemps, le seul animal infectable par le VHC a été le chimpanzé (*Pan troglodytes*) (Alter *et al.*, 1978). L'infection par le virus suit une progression identique à celle observée chez l'homme ; c'est-à-dire présence d'ARN viral détectable dans le sang quelques jours après l'infection, hépatite aigüe caractérisée par une augmentation des ALAT deux à vingt semaines après l'infection et développement d'une réponse immune adaptée. L'évolution dans 50% à 70% des cas, vers la persistance de l'infection se fait en dépit d'une réponse immune humorale et cellulaire adaptée. De plus, comme chez l'homme, l'infection chronique est associée à des lésions histologiques de l'hépatite chronique et à un risque d'hépatocarcinome (Bradley, 2000).

L'utilisation du modèle chimpanzé est cependant limitée par ses différences avec l'infection humaine (moindre sévérité de la maladie hépatique, réponse immune atténuée (Bassett *et al.*, 1998), par des problèmes éthiques (homologie génétique de plus de 98,5% avec l'homme), par le coût très élevé de ces animaux et de leur entretien ainsi que par leur disponibilité. Le chimpanzé étant une espèce protégée, son utilisation a été stoppée dans la plupart des pays. D'importants efforts sont mis en œuvre pour

développer des modèles de petits animaux de laboratoire et pour améliorer les systèmes cellulaires de propagation du virus.

1.2. Les autres modèles

Des infections expérimentales par le VHC ont été obtenues chez d'autres primates, tels que le marmouset (Feinstone *et al.*, 1981), le tamarin (Karayiannis *et al.*, 1983) et le tupaïa, un petit rongeur génétiquement proche des primates (Xie *et al.*, 1998). De plus, une étude a montré que des hépatocytes primaires de tupaïa peuvent être infectés, *in vitro*, par des sérums humains contaminés par le VHC et qu'ils produisent des particules virales infectieuses (Zhao *et al.*, 2002).

Récemment, des souris, qui ne sont pas naturellement susceptibles à l'infection, ont été humanisées, par greffe d'hépatocytes humains et il est possible de les infecter avec le VHC (Meuleman *et al.*, 2005). Ces souris uPA-SCID présentent une immunodéfiance combinée sévère (souris SCID) et sont porteurs d'un transgène activateur de plasminogène (Alb-uPA), conduisant à une destruction de leur foie, qui est ensuite recolonisé par des hépatocytes humains.

Ce modèle murin présente l'avantage d'être moins cher, d'entretien plus facile et de se reproduire plus vite que les primates. Il faut toutefois souligner que le modèle murin est très difficile à mettre en place, car il est nécessaire de pratiquer une intervention chirurgicale très délicate sur ces animaux et car la réponse immunitaire et les interactions virus-hôte sont limitées par le fond génétique murin de ces animaux.

2. Les modèles *in vitro*

2.2. Les glycoprotéines solubles

En l'absence de modèles appropriés, des approches biochimiques d'analyse fonctionnelle des glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 du VHC ont été tout d'abord entreprises. Ces études ont cependant été limitées par le fait que les glycoprotéines E1 et E2 ont tendance à s'agréger et à se replier de manière incorrecte lorsqu'elles sont sur exprimées *in vitro*. Ceci est dû à leur forte rétention dans le RE et de la présence de séquences d'hétérodimérisation dans leurs domaines transmembranaires (Cocquerel *et al.*, 2000).

La solution a été de déléter le domaine transmembranaire, produisant ainsi des formes solubles des glycoprotéines (Michalak *et al.*, 1997). Il a été montré que la glycoprotéine E2 soluble (sE2) se lie spécifiquement aux cellules hépatocytaires (Flint *et al.*, 1999). La protéine sE2 a servi à l'identification de facteurs cellulaires impliqués dans l'entrée du VHC, tels que le CD81 (Pileri *et al.*, 1998), le récepteur scavenger BI (SR-BI) (Scarselli *et al.*, 2002) et les héparanes sulfates (Barth *et al.*, 2003).

2.3. Les virus like-particules

Les virus like-particules (VLPs) sont produites dans des cellules d'insectes, infectées par un baculovirus recombinant codant les protéines structurales core, E1 et E2 du VHC (Baumert *et al.*, 1998). Ce modèle est intéressant parce que les cellules d'insectes possèdent des activités d'acylation et de glycosylation des protéines semblables à celles des cellules de mammifère et que le baculovirus permet de synthétiser de nombreuses protéines hétérologues en grande quantité. Les protéines produites s'auto-assemblent en VLPs, mais comme elles ne contiennent pas de génome entier, elles ne peuvent pas se répliquer. Les VLPs ne sont pas relarguées dans le milieu extracellulaire, suggérant qu'une étape de sécrétion est bloquée dans ce système. Les particules produites sont purifiées à partir de lysats de cellules d'insecte et présentent des caractéristiques morphologiques et biophysiques similaires à celles isolées à partir de sérum de patient infecté par le VHC (Baumert *et al.*, 1999). Il a pu être montré que les glycoprotéines virales sont correctement conformées dans les VLPs (Triyatni *et al.*, 2002). Par ailleurs, ces VLPs présentent des propriétés antigéniques semblables à celles du virus sauvage dans les tests de liaison ou de neutralisation, ce qui en fait un candidat vaccin potentiel (Baumert *et al.*, 1999; Steinmann *et al.*, 2004).

Toutefois, l'intérêt de cet outil se limite à l'étude des mécanismes d'attachement et d'interaction virus-hôte au niveau des récepteurs, car l'absence de marqueur génomique dans ces particules le rend inapproprié pour l'étude de l'entrée du virus.

2.4. Les pseudo-particules du VHC

Les pseudo-particules du VHC, ou VHCpp, sont des virus chimériques constitués des glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 du VHC, d'une capsidie du virus de la leucémie murine (MLV) ou du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et d'un gène rapporteur codant la GFP ou la luciférase (Bartosch *et al.*, 2003b; Hsu *et al.*, 2003). Les VHCpp sont obtenues par co-transfection de trois vecteurs codant pour les trois composants décrits précédemment (Figure 17). Les particules formées dans les cellules 293T sont sécrétées dans le milieu de culture et ce surnageant est utilisé pour infecter des cellules naïves. La production de VHCpp est relativement efficace, avec une moyenne de 10^5 unités infectieuses par mL de surnageant (Bartosch *et al.*, 2003b). En effet, des cellules de la lignée hépatocytaire Huh7 et des hépatocytes humains ont pu être infectés par les VHCpp (Bartosch *et al.*, 2003b). 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 E2 et par des sérums de patients infectés (Bartosch *et al.*, 2003a; Bartosch *et al.*, 2003b; Op De Beeck A. *et al.*, 2004).

Ce modèle se limite toutefois à l'étude de l'entrée du virus dans sa cellule cible.

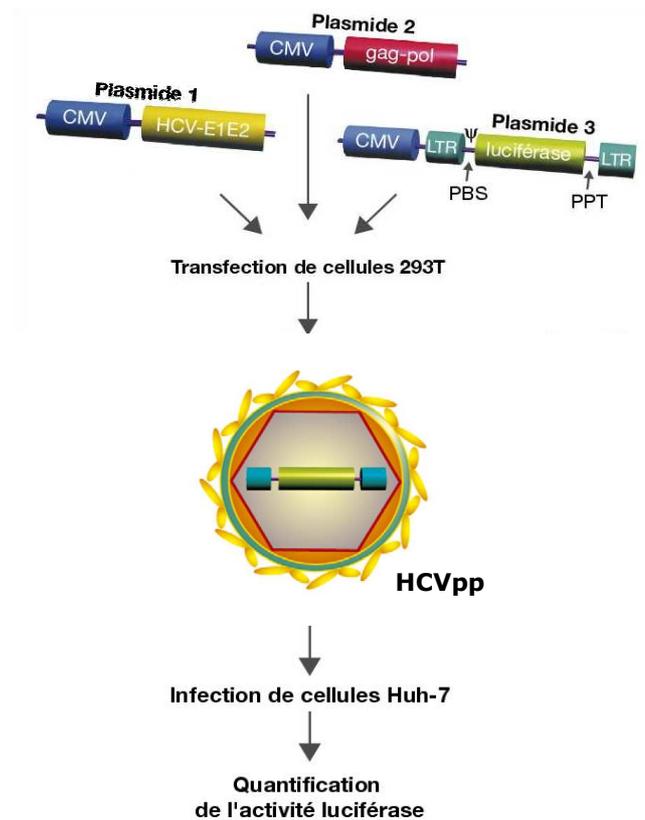


Figure 17 : Production de pseudo-particules VHCpp (d'après Voisset et al. 2004).

LTR, long terminal repeat ; CMV, promoteur précoce du cytomégalovirus ; PBS, site de fixation du primer ; ψ , séquence d'emballage ; PPT, séquence poly-purine ; polyA, site de polyadénylation.

2.5. Les réplicons subgénomiques et génomiques

En 1999, Lohmann et al., développent des réplicons subgénomiques du VHC rendant ainsi possible l'étude de la réplication virale (Lohmann *et al.*, 1999). Les réplicons sont des ARN réplicatifs autonomes bicistroniques 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 (NS3 à NS5B), le tout est encadré par les régions 5' et 3' NTR du VHC (Lohmann *et al.*, 1999). Ces constructions, une fois transcrites en ARN et transfectées dans des cellules Huh7 permettent, par sélection à la néomycine, d'isoler des clones cellulaires capables de répliquer de manière autonome le génome viral sous pression de sélection antibiotique (Figure 18).

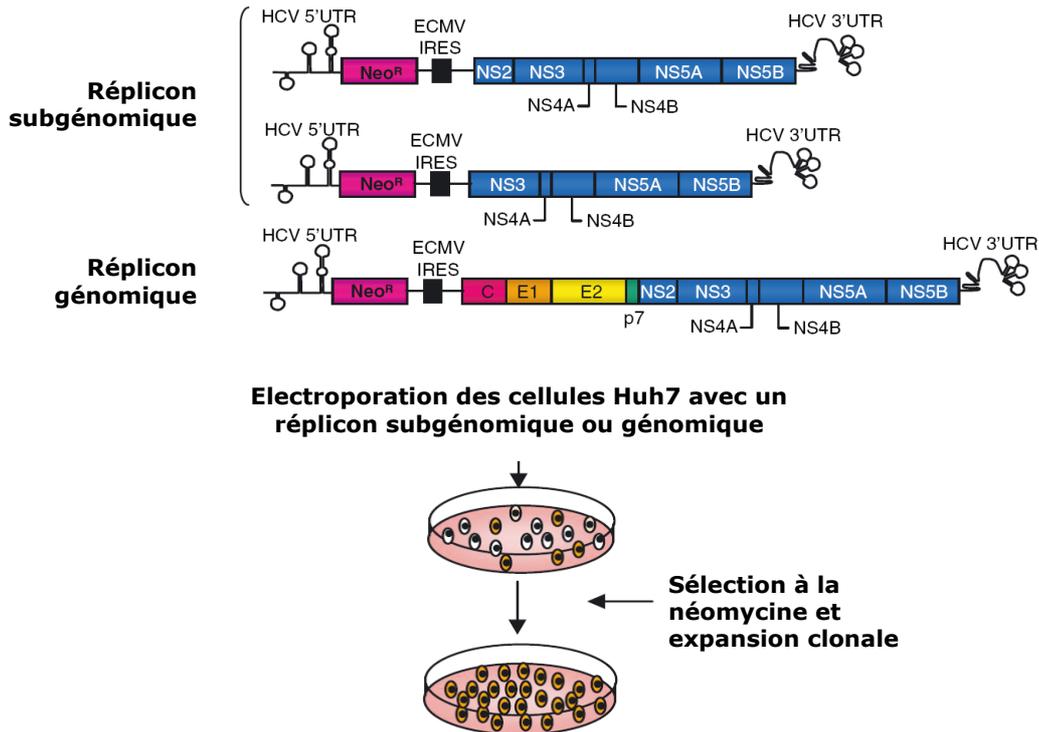


Figure 18 : Représentation schématique du système "réplicon VHC" (d'après Régeard et al. 2007).

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, des cellules répliquant très efficacement le réplicon, à l'IFN- α . Une fois guéries, elles ont été re-transfectées par l'ARN viral et elles présentent une plus forte capacité à répliquer le virus que les Huh7 (Blight *et al.*, 2002). Depuis, il a été montré que la lignée 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 répllication de l'ARN VHC dans ces cellules (Sumpter, Jr. *et al.*, 2005).

La culture cellulaire de ces réplicons subgénomiques conduit à l'apparition de mutations adaptatives qui augmentent significativement le taux de répllication des cellules transfectées (Blight *et al.*, 2000; Lohmann *et al.*, 2001). Un certain nombre de ces mutations ont été identifiées principalement dans NS3, NS4B et NS5A (Bartenschlager *et al.*, 2004). Plusieurs de ces mutations modifient l'état de phosphorylation de NS5A, dont la forme hyperphosphorylée est délétère pour la répllication du VHC dans les cellules Huh7 (Evans *et al.*, 2004).

Le réplicon est un outil de choix pour l'étude de la répllication de l'ARN viral et de certaines interactions virus-hôte. Les réplicons ont été couramment utilisés pour la validation de nouvelles drogues antivirales.

Les réplicons génomiques contenant la séquence complète du virus, bien que se répliquant efficacement en culture cellulaire sous pression de sélection antibiotique, ne permettent toutefois pas la production de particules virales infectieuses (Pietschmann *et al.*, 2002).

2.6. Les particules du VHC produites en culture cellulaire

En 2001, un clone particulier de VHC a été isolé chez un patient japonais atteint d'une hépatite C fulminante (Kato *et al.*, 2001). Ce clone, appelé JFH-1 (Japanese fulminant hepatitis), de génotype 2a, a été utilisé pour construire un réplicon subgénomique qui se réplique de façon transitoire dans les cellules Huh7 sans pression de sélection antibiotique (Kato *et al.*, 2003).

En 2005, trois équipes ont utilisé ce clone JFH-1 pour produire, directement après transfection de cellules Huh7 avec l'ARN viral, des particules virales infectieuses du VHC (Lindenbach *et al.*, 2005; Wakita *et al.*, 2005; Zhong *et al.*, 2005). Les virions produits dans le milieu de culture sont ensuite capables d'infecter des cellules Huh7 naïves (Figure 19). Ces VHCcc sont également infectieux chez le chimpanzé et chez des souris humanisées (Lindenbach *et al.*, 2005; Wakita *et al.*, 2005; Zhong *et al.*, 2005).

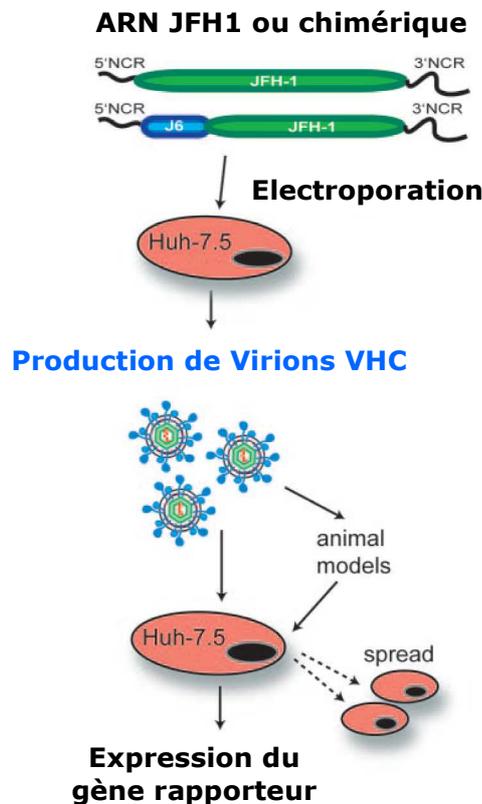


Figure 19 : Représentation schématique du système "VHCcc".

Des améliorations de ce système ont été faites par la construction de virus chimériques intra-génotypiques (Lindenbach *et al.*, 2005; Pietschmann *et al.*, 2006) ou inter-génotypiques (Pietschmann *et al.*, 2006) pour augmenter la production de particules infectieuses du VHC et pour pouvoir étudier l'entrée du VHC de différents génotypes. De plus, afin de faciliter la détection des cellules infectées, des virus exprimant un gène rapporteur (luciférase) ont également été produits (Koutsoudakis *et al.*, 2006).

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 (Wakita *et al.*, 2005), le tropisme préférentiel pour les cellules hépatiques (Lindenbach *et al.*, 2005; Wakita *et al.*, 2005; Zhong *et al.*, 2005) et le rôle des récepteurs impliqués dans l'entrée du VHC (Koutsoudakis *et al.*, 2006; Lindenbach *et al.*, 2005; Wakita *et al.*, 2005; Zeisel *et al.*, 2007; Zhong *et al.*, 2005). Ce modèle de 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.

IV. LE CYCLE VIRAL

L'étude du cycle viral du VHC a été freinée jusqu'en 2005 par l'absence de système cellulaire permettant la production de particules virales infectieuses du VHC. Néanmoins, les nombreux modèles, décrits précédemment, et la mise au point du système VHCcc ont pu apporter des réponses partielles qui ont permis d'établir un schéma général du cycle viral du VHC (Figure 20).

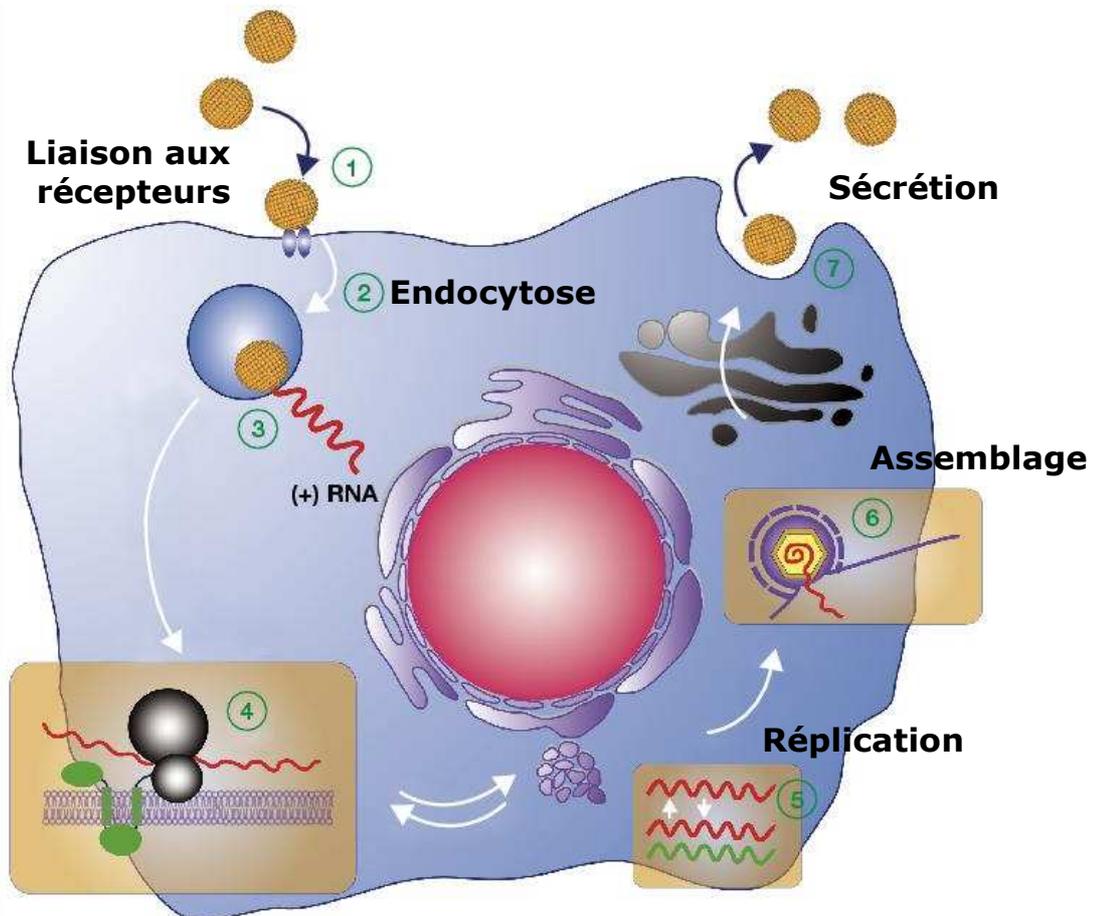


Figure 20 : Cycle viral du VHC (d'après Dubuisson 2007).

(1) Les virions se lient à la surface des cellules via des récepteurs. (2) Les particules sont ensuite endocytées par une voie dépendante de la clathrine (3) puis, décapsidées, permettant la libération de l'ARN viral dans le cytoplasme. (4) Le génome sert à la synthèse des protéines virales qui vont former le CR au niveau du RE. (5) La réplication de l'ARN du VHC conduit à la synthèse de nouvelles molécules d'ARN (+) (6) Les virions sont ensuite assemblés et (7) sécrétés.

1. Entrée

Les protéines virales impliquées dans l'entrée du VHC

1.1. Les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2

Les glycoprotéines E1 et E2 sont des composantes essentielles de l'enveloppe des virions et sont nécessaires à l'entrée du VHC dans les cellules cibles.

E1 et E2 sont des protéines transmembranaires comprenant chacune un grand ectodomaine N-terminal de 160 et 334 acides aminés respectivement, et un court domaine transmembranaire C-terminal d'une trentaine d'acides aminés hydrophobes (Cocquerel *et al.*, 2000). Dans leur forme fonctionnelle, ces protéines s'assemblent en hétérodimères non-covalents et cette association est dépendante des domaines transmembranaires (Op De Beeck A. *et al.*, 2001). La synthèse et la glycosylation de E1 et E2 ont lieu dans le RE, où les domaines N-terminaux sont dirigés vers la lumière du RE (Cocquerel *et al.*, 2002) (Figure 21).

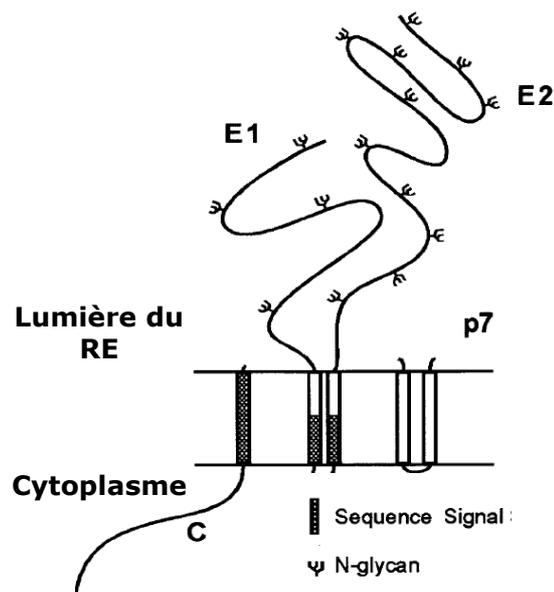


Figure 21 : Représentation schématique des glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 du VHC avec leurs sites de glycosylation (d'après Op De Beeck et al. 2001).

Les domaines transmembranaires de E1 et E2 sont multifonctionnels. En effet, ils ancrent les glycoprotéines dans la membrane du RE et contiennent des séquences essentielles pour la formation des hétérodimères E1E2 (Cocquerel *et al.*, 2000). Comme dans d'autres virus de la famille des Flaviviridae, ces régions transmembranaires sont composées de deux régions hydrophobes séparées par un petit domaine composé de résidus chargés très conservés (Cocquerel *et al.*, 2000). La seconde région hydrophobe de E1 agit comme un peptide signal pour la glycoprotéine E2 (Cocquerel *et al.*, 2002). Après clivage par la signal peptidase cellulaire, la conformation des domaines transmembranaires de E1 change, permettant la localisation cytosolique de son extrémité C-terminale.

Les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 sont fortement glycosylées. La présence de E2 est indispensable à la glycosylation correcte de E1 (Dubuisson *et al.*, 2000). C'est dans le RE que ces protéines vont subir différentes modifications post-traductionnelles dont la N-glycosylation (Goffard *et al.*, 2005). La N-glycosylation se fait par la

reconnaissance d'un motif précis d'acides aminés de type Asn-X-Ser/Thr-Y. La glycoprotéine E1 porte 4 ou 5 sites potentiels de N-glycosylation et la glycoprotéine E2 en porte 10 ou 11 en fonction du génotype viral (Figure 21). Ces sites potentiels sont fortement conservés entre les génotypes du VHC. Dans la voie de sécrétion des glycoprotéines, les glycanes rajoutés jouent un rôle important dans le repliement, dans le contrôle qualité et dans certains mécanismes de tri de ces protéines. Dans le cas des protéines d'enveloppe du VHC, les glycanes associés jouent un rôle majeur dans le repliement mais aussi dans les fonctions d'entrée du virus et dans la modulation de la réponse immunitaire (Lavie *et al.*, 2007). La glycosylation joue un rôle clé dans le cycle viral du VHC, puisque la suppression ou la mutation de certains sites de glycosylation induit une réduction de l'infectiosité des VHCpp. De plus, les glycanes associés à E2 masquent des domaines fonctionnels important pour l'accessibilité des anticorps neutralisants (Falkowska *et al.*, 2007; Helle *et al.*, 2007).

Les études réalisées à l'aide des VHCpp ont fourni la preuve que l'hétérodimère E1E2 est impliqué dans l'entrée du VHC (Bartosch *et al.*, 2003b). Le domaine de liaison de CD81 présent sur E2 requiert un bon repliement de la glycoprotéine pour jouer son rôle de facteur d'entrée. Les études du domaine de liaison à CD81 ont montré qu'il est composé de trois régions ; la première région est située entre les aa 480-493, la seconde s'étend des aa 528-535 tandis que la troisième englobe les aa 544-551 (Owsianka *et al.*, 2006). Des anticorps dirigés contre les aa 412-423 et 432-447, situées en-dehors des domaines de liaison de E2 à CD81, bloque l'interaction du CD81 avec les VLPs (Owsianka *et al.*, 2006). De plus, des résidus, conservés dans tous les génotypes du VHC critiques pour la reconnaissance de CD81, ont été identifiés (W420, Y527, W529, G530 et D535) (Owsianka *et al.*, 2006). Ainsi, il a été proposé qu'une interaction complexe, éventuellement à travers des interactions intramoléculaires entre plusieurs régions de E2 est responsable de la liaison au récepteur CD81 (Roccasecca *et al.*, 2003).

Par ailleurs, E2 contient une région hypervariable d'environ 27 acides aminés (384 à 410), appelée HVR1. La région HVR-1 de E2 est très hétérogène dans sa séquence et est responsable de variations significatives dans l'infectivité des particules infectieuses du VHC chez les patients et même au sein d'un même patient (quasi-espèces). Grâce à cette forte variabilité, le virus peut facilement échapper au système immunitaire et persister chez son hôte (Von Hahn T. *et al.*, 2007). La délétion de la région HRV-1 rend le virus moins infectieux dans le modèle chimpanzé confirmant ainsi le rôle de cette région dans l'infectivité du virus. (Forns *et al.*, 2000).

Malgré la variabilité de cette séquence HVR-1, ses propriétés physico-chimiques et sa conformation spatiale sont relativement conservées à travers les différents génotypes (Penin *et al.*, 2001). La région HVR-1 semble impliquée dans l'interaction du virus au

récepteur SR-BI (Scarselli *et al.*, 2002). De plus, des anticorps ciblant HVR1 inhibe l'entrée des VHCpp et la liaison des VLPs aux cellules (Bartosch *et al.*, 2003a).

D'autres régions hypervariables pouvant jouer un rôle dans l'entrée virale ont été décrites : HVR-2 (résidus 474 à 482) (Roccasecca *et al.*, 2003;Weiner *et al.*, 1991) et HVR-3 (résidus 431 à 466) (Troesch *et al.*, 2006).

Le rôle de E1 dans l'infection par le VHC reste encore mal compris, mais elle semble être impliquée dans le processus de fusion à la membrane nécessaire à l'internalisation du virus dans la cellule hôte (Lavillette *et al.*, 2007).

Les facteurs cellulaires impliqués dans l'entrée du VHC

Une des étapes importantes du cycle infectieux du virus de l'Hépatite C est l'attachement du virus à la cellule hôte puis son entrée dans cette cellule. Cette étape fait intervenir une cascade d'événements mettant en jeu le virus, via les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2, et de nombreux co-facteurs cellulaires.

Comme dit précédemment les particules virales sont présentes dans le milieu extérieur sous forme de LVPs (lipo-viro-particules). Dans un premier temps les glycosaminoglycanes (GAGs) et le récepteur aux LDL (LDL-R) présents à la surface de la cellule vont amorcer le processus d'ancrage des LVPs via les lipoprotéines, puis les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 vont reconnaître les co-facteurs cellulaires spécifiques du VHC qui sont la tétraspanine CD81 (Pileri *et al.*, 1998), le scavenger récepteur B-I (SR-BI) (Scarselli *et al.*, 2002), et les protéines de jonction claudin1, 6 et 9 (CLDN) (Evans *et al.*, 2007;Meertens *et al.*, 2008;Zheng *et al.*, 2007) et occludin (OCLN) (Liu *et al.*, 2009b;Ploss *et al.*, 2009).

1.2. Les molécules d'attachement

1.2.1. Les glycosaminoglycanes

Les GAGs, polysaccharides linéaires exprimés à la surface des cellules, sont caractérisés par une grande hétérogénéité structurale et sont des sites de liaison pour de nombreux virus. Les GAGs sont impliqués dans l'interaction initiale du virus avec la surface de la cellule avant de se lier aux récepteurs spécifique du VHC. Il existe différents type de GAGs, mais ce sont les GAGs hautement sulfatés comme les héparanes sulfates qui semblent être impliqué dans la liaison de nombreux virus, dont le VHC. L'utilisation d'héparine, un analogue de l'héparine sulfate ou d'héparinase, une enzyme dégradant les héparanes sulfate, inhibe l'attachement du VHC aux cellules. De même le traitement des cellules avec des glycosidases réduit l'infectiosité du virus (Barth *et al.*, 2006).

L'attachement du virus aux héparanes sulfates semble jouer un rôle essentiel dans les étapes précoces de l'infection par le VHC. Cependant, le rôle exact des GAGs dans l'entrée du VHC reste inconnu. Une forme soluble de E2 (sE2) se lie à l'héparine

avec une haute affinité, mais des études utilisant des VHCpp, n'ont pas réussi à confirmer ces résultats (Callens *et al.*, 2005). Ces observations suggèrent que, soit le site de liaison des héparanes sulfates n'est pas accessible au niveau de l'hétérodimère fonctionnel E1E2 présent dans les VHCpp soit, l'attachement du VHC est médiée par des lipoprotéines associées aux particules virales. En effet, la lipoprotéine lipase (LPL) pourrait intervenir indirectement dans les interactions entre le VHC et les GAGs (Andreo *et al.*, 2007). La LPL agit en formant un pont entre le virus via ses lipoprotéines associées et les héparanes sulfates présents à la surface des cellules (Andreo *et al.*, 2007).

1.2.2. Le récepteur des LDL

Dans le sérum des patients infectés, les particules virales du VHC sont souvent associées aux LDL ou aux VLDL, sous forme de LVP (Andre *et al.*, 2002). De ce fait, le récepteur des LDL a été proposé comme un co-facteur d'entrée du VHC (Agnello *et al.*, 1999). L'entrée du VHC peut-être bloquée en utilisant des anticorps anti-LDLR, anti-apoB et anti-apoE, et par l'addition de LDL et de VLDL purifiés (Agnello *et al.*, 1999; Bartosch *et al.*, 2003c; Chang *et al.*, 2007).

Malheureusement, la fonction de ce récepteur dans l'infection par le VHC reste controversée, puisque son rôle dans l'infection par les VHCcc n'a pas encore été clairement défini. Comme SR-BI, le LDL-R peut participer à l'entrée du virus via les lipoprotéines associées au VHC, et précède ainsi l'interaction du virus avec CD81.

1.2.3. Les lectines de type C

La protéine E2, les VHCpp et les particules virales de sérum de patients infectés se lient spécifiquement à L-SIGN et DC-SIGN, deux molécules appartenant à la famille des lectines de type C. Ces molécules sont capables de reconnaître des structures glycanes de manière dépendante du Ca^{2+} . Elles ne sont pas spécifiques du VHC car elles ne sont pas exprimées au niveau des hépatocytes. En effet, DC-SIGN est exprimé sur les cellules dendritiques et les cellules de Kupffer, alors que L-SIGN est exprimé à la surface des cellules endothéliales sinusoidales du foie. Il a été montré que la liaison de E2 à L-SIGN pouvait induire la transmission de VHCpp à des cellules hépatiques adjacentes (Par co-culture de cellules Huh7 et cellules Hela exprimant DC-SIGN ou L-SIGN pré-incubées avec des VHCpp. Ce mécanisme est plus efficace pour L-SIGN que DC-SIGN) (Cormier *et al.*, 2004) mais ces molécules ne permettent pas, par elles mêmes, l'entrée des VHCpp et VHCcc (Lai *et al.*, 2006). Ces molécules pourraient contribuer à l'établissement de l'infection persistante en capturant et concentrant le virus à la proximité des hépatocytes (Cormier *et al.*, 2004).

1.3. Les récepteurs

1.3.1. CD81

CD81 a été le premier récepteur d'entrée du VHC identifié (Pileri *et al.*, 1998). Il appartient à la famille des tétraspanines. Ces dernières sont formées de quatre domaines transmembranaires, de deux boucles extracellulaires SEL et LEL (small and large extracellular loop), d'une petite boucle intracellulaire et de deux extrémités N et C-terminales (Figure 22). La grande boucle LEL contient des motifs cystéines-cystéines-glycines importants pour la formation de ponts disulfures. La liaison de E2 au CD81 se fait au niveau de la grande boucle LEL et nécessite la présence de quatre résidus conservés : L162, I182, N184 et F186 (Drummer *et al.*, 2002).

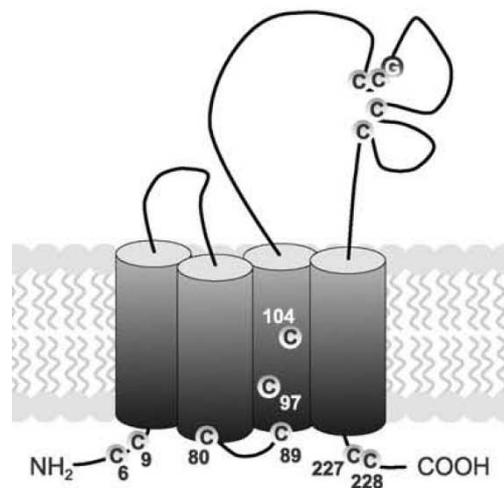


Figure 22 : Structure de CD81 (d'après Delandre *et al.* 2009).

Les tétraspanines forment à la surface des cellules des microdomaines enrichis en tétraspanines. Ce sont des organisateurs moléculaires, qui ont pour fonction de relier des protéines membranaires au niveau extra- et intracellulaire à d'autres tétraspanines en un réseau hautement organisé, servant de plateforme aux diverses voies de signalisation (Charrin *et al.*, 2009). Toutefois, l'association de CD81 avec ces microdomaines enrichit en tétraspanines ne semblent pas être nécessaire pour l'entrée du VHC (Rocha-Perugini *et al.*, 2009). Récemment, une protéine de surface, EWI-2wint, issue du clivage de la protéine EWI-2, appartenant au réseau des tétraspanines et interagissant avec CD81, a été décrite comme capable d'inhiber l'interaction entre le récepteur CD81 et les glycoprotéines d'enveloppe du VHC (Rocha-Perugini *et al.*, 2008). La protéine EWI-2 est présente à la surface des hépatocytes (Charrin *et al.*, 2003) mais la forme tronquée EWI-2wint est absente. EWI-2wint agirait donc comme un facteur de restriction d'hôte (Rocha-Perugini *et al.*, 2008)

En l'absence de système permettant la production de particules infectieuses du VHC, les premières recherches sur le(s) récepteur(s) du VHC ont utilisé des formes solubles sE2, permettant ainsi, la découverte du récepteur CD81. L'apparition de nouveau modèle d'études VHCpp (Bartosch *et al.*, 2003b) et VHCcc (Lindenbach *et al.*, 2005; Wakita *et al.*, 2005; Zhong *et al.*, 2005) et l'utilisation anticorps neutralisants anti-CD81 ont confirmé l'implication de CD81 à un stade tardif de l'entrée virale. Toutefois, la surexpression de CD81 dans des cellules non permissives au VHC ne rend pas ces cellules permissives au VHC. De plus, CD81 est un récepteur ubiquitaire qui ne permet pas d'expliquer le tropisme restreint du VHC (Levy *et al.*, 1998). Ainsi, CD81 ne joue que le rôle d'un co-facteur dans l'entrée virale et nécessite la coopération de plusieurs autres co-facteurs (pour une revue voir : Perrault and Pecheur, 2009).

1.3.2. SR-BI

Le scavenger récepteur BI a été identifié comme co-facteur du VHC en utilisant des glycoprotéines E2 immobilisées sur des colonnes d'affinité (Scarselli *et al.*, 2002).

Cette glycoprotéine exprimée à la surface des cellules contient deux domaines transmembranaires, une grande boucle extracellulaire et deux courts domaines intracellulaires (Figure 23). SR-BI est fortement exprimé au niveau du foie mais aussi au niveau des tissus stéroïdogènes (ovaires et glandes surrénales). La fonction première de SR-BI est de lier les HDL. Cette protéine joue un rôle majeur dans le contrôle de la concentration plasmatique des HDL, en facilitant l'entrée sélective du cholestérol estérifié des HDL dans la cellule et en régulant le flux sortant du cholestérol cellulaire. SR-BI joue également un rôle dans le métabolisme des VLDL et être un récepteur pour ces lipoprotéines (Van Eck M. *et al.*, 2008).

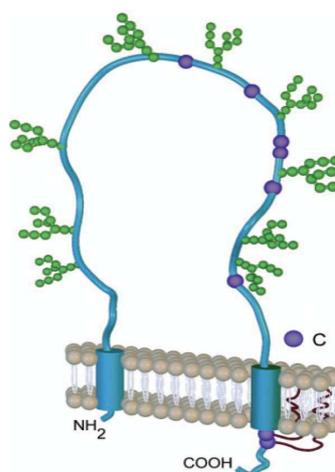


Figure 23 : Structure de la protéine SR-BI (d'après Cocquerel *et al.* 2006).

La boucle extracellulaire contient neuf sites potentiels de glycosylation (en vert) et six cystéines (en violet). SR-BI est palmitoylé au niveau de deux cystéines localisées à l'extrémité C-terminale.

A l'origine SR-BI a été identifié comme récepteur du VHC car il peut se lier de manière spécifique à E2 lors d'une chromatographie d'affinité (Scarselli *et al.*, 2002). Par la suite l'utilisation de petits ARN interférents (siARN) inhibant l'expression de SRB-1 ou d'anticorps anti-SR-BI pouvant bloquer l'infection des cellules par les VHCpp et VHCcc ont confirmé l'importance de SR-BI dans l'entrée virale (Bartosch *et al.*, 2003c;Voisset *et al.*, 2005;Zeisel *et al.*, 2007). Par ailleurs la surexpression du récepteur SR-BI permet d'augmenter l'infection par les VHCpp et VHCcc (Schwarz *et al.*, 2009). De plus, il semblerait que la région HVR1 de la glycoprotéine E2 soit nécessaire à la reconnaissance de ce récepteur (Barth *et al.*, 2005;Bartosch *et al.*, 2003c).

Deux ligands naturels de SR-BI ont une forte influence sur l'infectivité du VHC. En effet, les HDL augmentent l'infectivité du VHC et la forme oxydée des LDL (oxLDL) inhibent l'infection par le VHC (Dreux *et al.*, 2006). De plus, l'utilisation d'inhibiteur spécifique du transfert lipidique médié par SR-BI (BLT-3 et BLT-4) annule l'effet positif des HDL sur l'infectivité (Bartosch *et al.*, 2005;Dreux *et al.*, 2006;Voisset *et al.*, 2006). Ceci suggère que l'infection par le VHC peut être dépendante de la fonction de SR-BI dans le métabolisme lipidique.

Très récemment, en utilisant des VHCcc, des glycoprotéines solubles et des mutants SR-BI, Catanese *et al.*, ont identifié les résidus spécifiques de SR-BI nécessaire à l'attachement de la glycoprotéine d'enveloppe E2 (acides aminés 70 à 87 et le résidu E210) (Catanese *et al.*, 2009). De plus, ces mutants SR-BI gardent leur capacité à lier les HDL et à réguler le flux sortant de cholestérol suggérant ainsi la duplicité de SR-BI, à lier d'une part les HDL et d'autre part les particules virales du VHC.

1.3.3. Claudines

(a) CLDN récepteur du VHC

Tous les récepteurs décrits précédemment n'expliquant pas le tropisme restreint du VHC, un clonage d'expression a été réalisé en transduisant un banque rétrovirale d'ADNc de cellules hépatiques humaines dans des cellules non hépatiques et non permissives au VHC afin d'identifier un récepteur spécifique. Ce criblage a permis l'identification d'un nouveau co-facteur nécessaire à l'entrée du virus, la protéine des jonctions serrées CLDN1 (Evans *et al.*, 2007). CLDN1 est fortement exprimée au niveau du foie mais aussi au niveau d'autres tissus épithéliaux (Furuse *et al.*, 1998).

La protéine de jonction CLDN1 fait partie de la superfamille des tétraspanines et de la famille des claudines qui comprend à ce jour 24 membres. Les CLDNs sont des protéines transmembranaires impliquées dans la formation des jonctions serrées. Les jonctions serrées régulent la perméabilité paracellulaire et maintiennent la polarité cellulaire dans les épithéliums et les endothéliums (Van Itallie and Anderson, 2006). Ces protéines contiennent deux extrémités N et C-terminales dirigées vers le cytoplasme,

quatre domaines transmembranaires et deux boucles extracellulaires (EL1 et EL2) (Figure 24) (Lal-Nag and Morin, 2009; Van Itallie and Anderson, 2006).

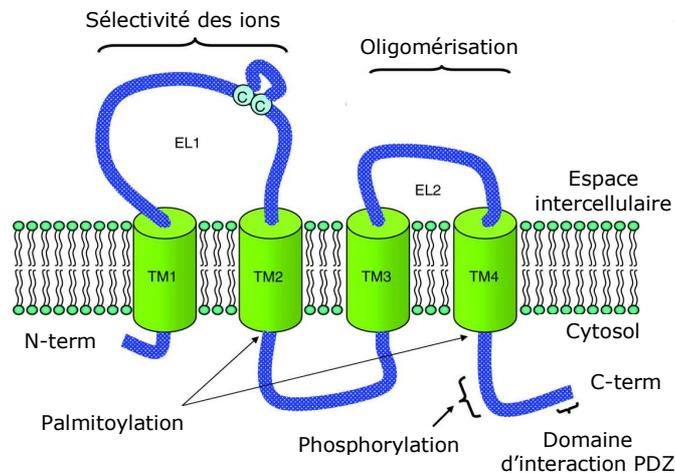


Figure 24 : Structure de la protéine de jonction CLDN1 (d'après Eyre, Lal-Nag and Morin 2009).

La boucle EL1 contient plusieurs acides aminés chargés qui vont influencer la sélectivité des ions chargés échangés. Les CLDNs contiennent au niveau de la boucle EL1 un motif structural très conservé W(30)-GLW(51)-C(54)-C(64) dont les deux résidus cystéines forment un pont disulfure qui stabilise la protéine. Par mutagenèse dirigée, Cukiermann et al., ont montré que ces résidus sont importants pour l'entrée du VHC, en plus des résidus I32 et E48 (Cukierman *et al.*, 2009; Tellinghuisen *et al.*, 2007). Par la méthode de BiFC (Bimolecular fluorescence complementation) ils ont également montré que ces mutants ne sont plus capables d'interagir en trans, interaction nécessaire pour l'adhésion entre les cellules (Cukierman *et al.*, 2009). Ces résultats suggèrent que les zones de contact formées par CLDN1 semblent être localisées au niveau d'un domaine membranaire spécialisé nécessaire pour l'entrée du VHC. Il a été suggéré également que la boucle EL2 peut former des dimères avec des CLDNs situées sur la face opposée (Figure 25).

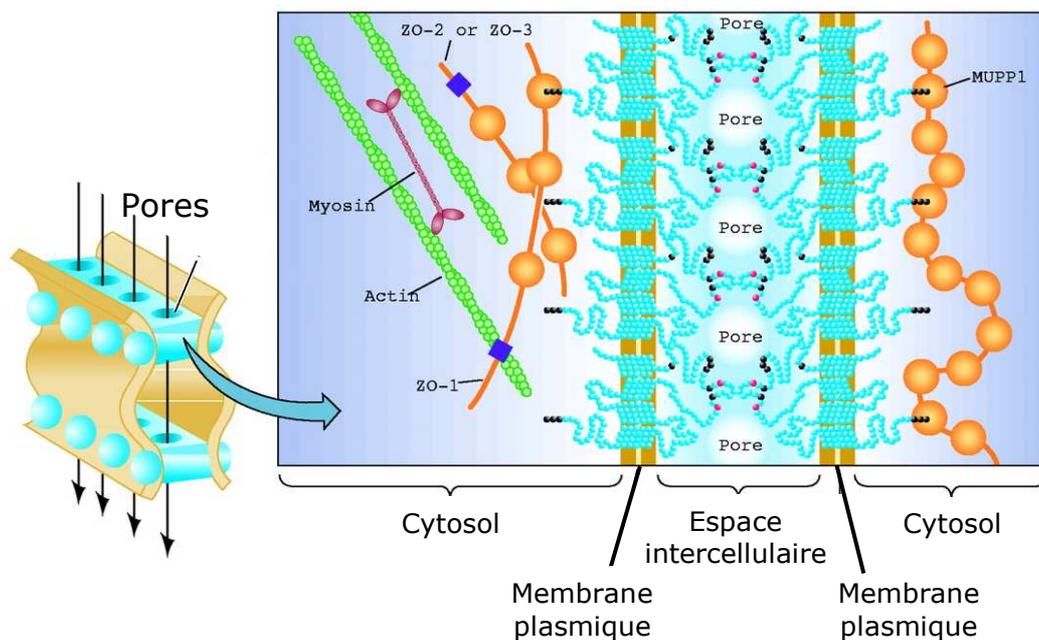


Figure 25 : Modèle d'assemblage des CLDNs dans les jonctions serrées (d'après Van Itallie and Anderson 2006).

Deux cellules vont s'associer latéralement, via les CLDNs présentes sur la surface des deux cellules, pour former une jonction serrée. Cette association forme des pores permettant le passage sélectif des ions.

La partie C-terminale contient un motif PDZ d'interaction avec des protéines cytoplasmiques d'ancrage, tels ZO-1, ZO-2, ZO-3 et MUPP1 responsable de l'ancrage au cytosquelette d'actine (Figure 25). La queue carboxy-terminale est la cible de diverses modifications post traductionnelles, (phosphorylation et palmitoylation), qui peuvent altérer de façon significative la localisation et la fonction de CLDN. Le domaine C-terminal ainsi que les sites de phosphorylation et palmitoylation ne sont pas requis pour l'infection par le VHC (Evans *et al.*, 2007).

A ce jour, aucune équipe n'a montré une interaction directe entre les glycoprotéines d'enveloppe E1E2 et le récepteur CLDN1. Mais le débat reste ouvert depuis que Yang *et al.*, ont montré qu'en surexprimant ces molécules dans des cellules non permissives au VHC (293T, Hela et GHOST), E1E2 et CLDN1 peuvent interagir (Yang *et al.*, 2008b).

L'étude de coupes de foie a permis de localiser la protéine CLDN1 à la fois au niveau de la région canaliculaire apicale et au niveau de la région sinusoidale basolatéral des hépatocytes (Reynolds *et al.*, 2008). Les cellules hépatocytaires HepG2 exprimant CD81 montre le même pattern (Mee *et al.*, 2009). De plus, ces deux études montrent que CLDN1 et CD81 co-localisent au niveau des régions apical et basolatéral des cellules hépatocytaires et des hépatocytes. Alors que CLDN1 et SR-BI ne co-localisent qu'au

niveau basolatéral des hépatocytes. Stimulé par le cholestérol, SR-BI subit une transcytose du côté basolatéral vers les canaux biliaires (Harder *et al.*, 2007). Cette observation suggère que SR-BI interviendrait avant le recrutement de CD81 et CLDN1.

L'expression de la protéine CLDN1 dans des cellules non permissives au VHC telles 293T et SW-13 les rend permissives à l'infection par les VHCpp et VHCcc. La réduction de l'expression de CLDN1 dans des cellules hépatiques par des siARNs entraîne une diminution de l'infection par les VHCpp et VHCcc. La surexpression de CLDN1, contrairement à SR-B1, n'augmente pas l'infektivité (Evans *et al.*, 2007; Schwarz *et al.*, 2009).

En 2007, Evans *et al.*, ont montré que des anticorps dirigés contre un FLAG TAG épitope inséré dans la EL1 de CLDN1 étaient capables d'inhiber l'infection par le VHC de façon dose dépendante (Evans *et al.*, 2007). Les cinétiques d'inhibition d'entrée du VHC suggèrent que CLDN1 intervient tardivement dans le processus d'entrée. En effet, avec une $t_{1/2}$ d'inhibition de l'infection de 73 minutes, les auteurs proposent que CLDN1 agit après interaction du virus avec les co-facteurs d'entrée SR-BI et CD81 (Evans *et al.*, 2007). Des études de fusion cellulaire ont par ailleurs montré que CLDN1 est nécessaire pour l'étape de fusion, mais son implication dans ce processus n'est pas clairement défini (Evans *et al.*, 2007).

En substituant la CLDN1 humaine par la CLDN1 murine, l'infection par les VHCpp n'est pas affectée, ceci suggère que CLDN1 n'est pas un facteur clé déterminant la spécificité d'espèce.

Par ailleurs, deux équipes ont montré que les CLDN6 et -9 semblent être impliquées dans l'entrée du VHC dans la cellule hôte (Meertens *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 2007). Comme CLDN1, ces molécules sont exprimées dans le foie et contrairement à CLDN1, elles sont également présentes à la surface des PBMCs (peripheral blood mononuclear cells). Par mutagenèse dirigée, Zheng *et al.*, ont montré que les résidus N38 et V45 de CLDN9 sont importants pour l'infection par le VHC. De plus, les résidus I32 et E48 importants pour l'infection par la protéine CLDN1 (Evans *et al.*, 2007) le sont également pour l'infection par CLDN9 (Zheng *et al.*, 2007).

L'expression des CLDN1, -6 ou -9 dans des cellules 293T exprimant CD81 les rendent, de manière comparable, permissive à l'infection par des VHCpp de différents génotypes (Meertens *et al.*, 2008). L'infection peut-être inhibée par l'utilisation d'anticorps neutralisant anti-CD81, de sérums de patients VHC positifs et par traitement à la bafilomycine A1, un inhibiteur de l'endocytose. Ces résultats suggèrent que l'expression des CLDNs ne modifie pas le rôle de CD81 et de l'acidification endosomal dans l'entrée et l'internalisation du virus.

A l'inverse, la surexpression des CLDN1, -6 et -9 dans des lignées hépatocytaires, telles les H1H et NKNT3 qui expriment CD81, ne suffit pas à rendre ces cellules

permissives à l'infection par le VHC (Meertens *et al.*, 2008), tout comme des cellules HeLa et HepH exprimant CLDN1 en plus de SR-BI et CD81 demeurent résistantes à l'infection par le VHC (Evans *et al.*, 2007). Ces résultats suggèrent que d'autres facteurs cellulaires sont requis pour l'entrée du VHC dans les cellules cibles.

(b) CLDN protéine des jonctions serrées

Les jonctions serrées constituent un rapprochement étroit et localisé des membranes de deux cellules voisines.

La fonction première des jonctions serrées est d'assurer l'étanchéité et la polarité des épithéliums et des endothéliums. Elles ont longtemps été considérées comme une simple barrière séparant deux compartiments. Dans le cas des hépatocytes, ces jonctions séparent les canalicules biliaires engagés dans la sécrétion de la bile et la lumière du sinusoiide, en contact constant avec le sang (Figure 26). Cette barrière semi-perméable est nécessaire au transport des ions, de solutés et d'eau à travers l'espace intercellulaire et empêche le passage des indésirables tels que les toxines, antigènes et autres microbes (Anderson and Van Itallie, 2008). La plupart des types cellulaires expriment diverses CDLNs qui s'associent entre elles de façon homologue ou hétérologue pour former les jonctions serrées. C'est la composition en CLDNs qui définit la sélectivité des pores et la force de la jonction.

Les jonctions serrées sont formées d'au moins 40 protéines différentes, incluant les CLDNs, l'occludin (OCLN) et les junctional adhesion molecules (JAMs) plus toutes les autres protéines intracellulaires associées, appelées protéines d'ancrage et de polarité. Ces protéines forment une plateforme d'ancrage (connecteurs ZO-1, ZO-2 et ZO-3) pour le cytosquelette d'actine et les protéines impliquées dans la polarité (Chiba *et al.*, 2008).

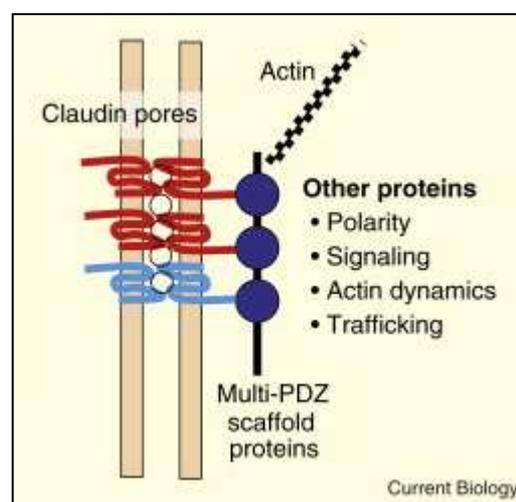


Figure 26 : Schéma d'une jonction serrée (d'après Anderson and Van Itallie 2008). Les jonctions serrées sont composées des protéines de jonction, CLDN, OCLN et JAMs et des protéines intracellulaires.

Cette plateforme est importante pour la transduction de signaux impliqués dans la polarisation et l'assemblage des épithéliums ainsi que dans la prolifération et la différenciation cellulaire. Les jonctions serrées ne sont pas des structures statiques mais elles peuvent rapidement se remodeler en réponse à des stimuli extra- ou intracellulaires. En effet, 24% des CLDN1, 70% des OCLN et ZO-1 des jonctions serrées sont dans une fraction mobile (Shen *et al.*, 2008).

1.3.4. Occludine

Les récepteurs décrits précédemment n'expliquant pas le tropisme restreint du VHC, un clonage d'expression a été réalisé en transduisant une banque rétrovirale d'ADNc d'une lignée d'hépatocarcinome humaine (Huh7.5) dans des cellules hépatiques murines NIH3T3 exprimant les récepteurs SR-BI, CD81 et CLDN1, appelées N3xF26. Les cellules sont ensuite mises en présence de VHCpp. Ce criblage a permis l'identification d'un nouveau co-facteur d'entrée du VHC, la protéine de jonction occludine (OCLN) (Ploss *et al.*, 2009). L'importance d'OCLN dans le mécanisme d'entrée du VHC a également été montrée par Liu *et al.*, par l'utilisation de siARNs (Liu *et al.*, 2009b).

OCLN contient deux extrémités N et C-terminales dirigées vers le cytoplasme, quatre domaines transmembranaires et deux boucles extracellulaires de même taille (EL1 et EL2) (Figure 27). Les cellules permissives (lignées hépatocytaires) ou non permissives (HepG2 et 293T) au VHC expriment OCLN. Le récepteur OCLN interagit directement avec la glycoprotéine d'enveloppe E2 (Benedicto *et al.*, 2009), contrairement au récepteur CLDN1. OCLN est supposé être un co-facteur tardif dans le mécanisme d'entrée du VHC au même titre que CLDN1.

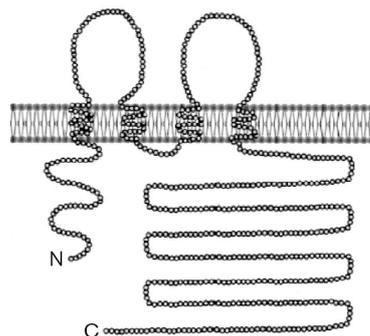


Figure 27 : Structure de la protéine de jonction OCLN (d'après Tsukita, Furuse and Itoh 1999).

En surexprimant différentes combinaisons des quatre co-facteurs SR-BI, CD81, CLDN1 et OCLN murins et humains dans des lignées de hamster ou de souris (CHO et NIH3T3), Ploss *et al.*, ont montré que l'expression des récepteurs humains CD81 et OCLN

sont importants pour l'infection par les VHCpp, alors que les récepteurs SR-BI et CLDN1 peuvent être d'origine murine (Ploss *et al.*, 2009). Il est à noter toutefois, que les taux d'entrée des VHCpp dans les cellules murines sont moins importants que les taux d'entrée obtenus avec des cellules hépatiques humaines (Ploss *et al.*, 2009). Cette nouvelle découverte ouvre enfin la voie à l'utilisation d'un modèle murin pour l'étude du VHC. Toutefois, les cellules murines exprimant les récepteurs murins SR-BI et CLDN1 et les récepteurs humains CD81 et OCLN sont très peu infectées par les VHCcc, ceci est en accord avec les résultats de Uprichard *et al.*, qui avaient déjà montré que les cellules murines répliquaient très faiblement l'ARN du VHC (Uprichard *et al.*, 2006).

1.4. Modèle d'entrée du VHC

Au vu du nombre de co-facteurs d'entrée déjà identifiés et des résultats obtenus par différents groupes de recherche une organisation séquentielle des événements régissant l'entrée du virus peut être proposée. Ceci est résumé dans la Figure 28.

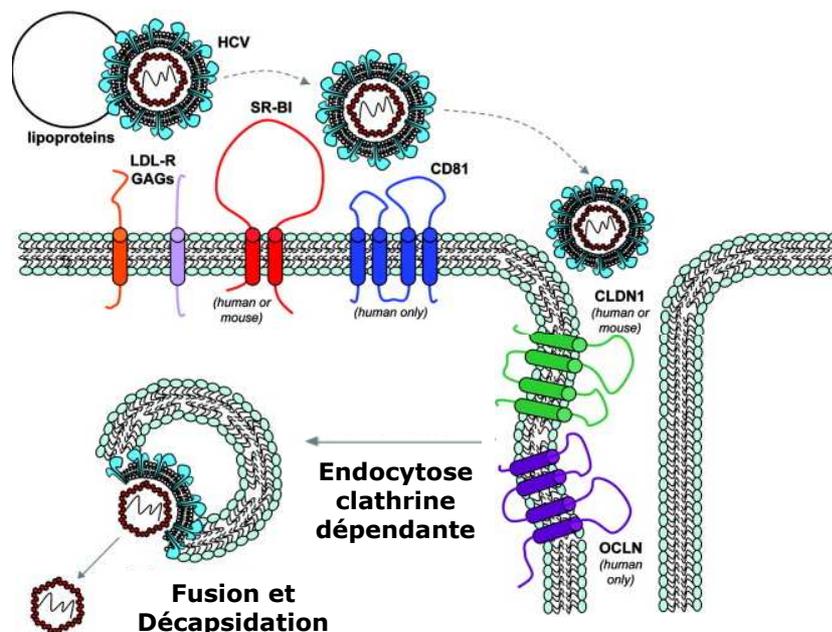


Figure 28 : Modèle d'entrée du VHC (d'après Eyre, Baumert and Beard. 2009).

La particule virale, provenant de la circulation sanguine, associée aux lipoprotéines, s'attache de manière non spécifique aux GAGs et aux LDL-R de la surface des hépatocytes. Elle reconnaît ensuite spécifiquement SR-BI au niveau du pôle basolatéral. SR-BI va amener cette particule virale au niveau de CD81. L'interaction des glycoprotéines d'enveloppe E1E2 avec le récepteur CD81 induit sa relocalisation au niveau des jonctions cellulaires (Brazzoli *et al.*, 2008) où il va rencontrer les protéines de

jonction CLDN1 et OCLN. Cette étape est suivie par l'endocytose de la particule via les puits à clathrines (Blanchard *et al.*, 2006). Une fois internalisé, le virus est dirigé vers les endosomes précoces où la fusion des membranes, favorisées par un pH acide, entraîne la libération de la capsid (Figure 28)

Le modèle d'entrée du VHC présenté est basé sur celui du coxsackievirus B, dont la liaison à un facteur d'attachement appelé DAF (decay-accelerating factor) sur la surface apicale de cellules épithéliales Caco-2 induit des signaux intracellulaires qui permettent aux virus de se relocaliser au niveau des jonctions serrées (Coyne and Bergelson, 2006). Là, le virus peut interagir de manière spécifique avec son récepteur CAR et pénétrer dans la cellule par un mécanisme cavéoline-dépendant. Dans le cas du VHC, il reste peut-être à découvrir ce récepteur spécifique.

2. Internalisation de la particule virale et fusion

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 (majorité des rétrovirus). La seconde est l'endocytose de la particule virale puis la fusion de l'enveloppe avec la membrane de l'endosome (virus de la grippe ou virus de la stomatite vésiculaire) (Sollner, 2004).

Dans le cas du VHC, il a été montré que la particule virale est endocytée via les puits à clathrines (Blanchard *et al.*, 2006) et ce n'est que dans les endosomes précoces, sous l'effet du pH acide (Meertens *et al.*, 2006), que les membranes fusionnent pour libérer le génome viral dans le cytosol. Plusieurs laboratoires proposent que ce processus induit des changements de conformation des protéines d'enveloppe (Bartosch *et al.*, 2003c; Blanchard *et al.*, 2006; Hsu *et al.*, 2003; Koutsoudakis *et al.*, 2006; Meertens *et al.*, 2006; Tscherne *et al.*, 2006).

Il existe deux grandes classes de protéines de fusion : classe I et classe II. Les protéines de fusion de classe I (l'hémagglutinine du virus de la grippe ou la gp41 du VIH) sont synthétisées sous forme d'un précurseur qui va être clivé par les protéases cellulaires libérant le peptide fusogène N-terminal qui va s'ancrer dans la membrane cellulaire (Sollner, 2004).

Du fait de son appartenance à la famille des Flaviviridae, la pensée commune soutient le fait que les glycoprotéines d'enveloppe ont un mode de repliement semblable à celui des protéines de fusion de classe II (Sollner, 2004). Ces protéines ne sont pas clivées au cours de leur biosynthèse mais possèdent un peptide de fusion interne ayant une conformation en boucle. Elles sont synthétisées sous forme d'un complexe dont une agit comme chaperonne de l'autre. L'activation du pouvoir fusogène de la protéine de fusion fait suite au clivage de la protéine chaperonne. La fusion est induite par un mécanisme pH dépendant. Dans le cas du VHC, le rôle précis de E1E2 dans cette étape

du cycle viral n'est pas encore défini. Les deux glycoprotéines E1 et E2 ne répondent pas au schéma classique des protéines de fusion de classe II, car elles ont l'une pour l'autre une activité chaperonne (Lavie *et al.*, 2007) et qu'elles semblent intervenir toutes les deux dans le processus de fusion (Lavillette *et al.*, 2007).

3. Traduction de la polyprotéine virale

Une fois libéré dans le cytoplasme, l'ARN génomique viral de polarité positive est pris en charge par la machinerie traductionnelle cellulaire et est traduit en une polyprotéine de 3000 acides aminés.

Les ARN messager cellulaires sont en général traduits de manière cap-dépendante par la cellule eucaryote. L'ARN du VHC, au contraire, est traduit par un processus médié par l'IRES. L'IRES du VHC forme une structure complexe qui permet la traduction de l'ARN viral de manière cap-indépendante. Elle est composée de trois domaines structuraux majeurs (II, III, IV). Les domaines II, III et IV ainsi que les 24-40 premiers nucléotides de la région de core constituent l'IRES. La sous-unité 40S du ribosome se fixe directement sur le domaine II. Ce complexe permet de recruter, au niveau de l'AUG initiateur, le facteur d'initiation eucaryote eIF3 et le complexe ternaire Met-ARN^t_{Met}•eIF2•GTP formant ainsi un intermédiaire non-canonique 48S. L'étape suivante est l'association, de manière GTP-dépendante, de la sous-unité 60S pour former un complexe 80S (Figure 29). La structure 3D de l'IRES s'attachant à la sous-unité 40S et au facteur eIF3 a été résolue par cryo-microscopie électronique. Il semblerait que la liaison du facteur eIF3 à l'IRES induise un changement de conformation important au niveau de la sous-unité 40S, processus nécessaire pour l'assemblage du ribosome 80S (Boehringer *et al.*, 2005; Ji *et al.*, 2004). La modélisation du complexe eIF3.IRES.40S a révélé que ce complexe se forme quand le facteur eIF3 reconnaît l'IRES du VHC et que cette reconnaissance se fait par le même domaine qui permet à eIF3 de fixer eIF4F lors de la traduction coiffe-dépendante d'un ARN messager classique.

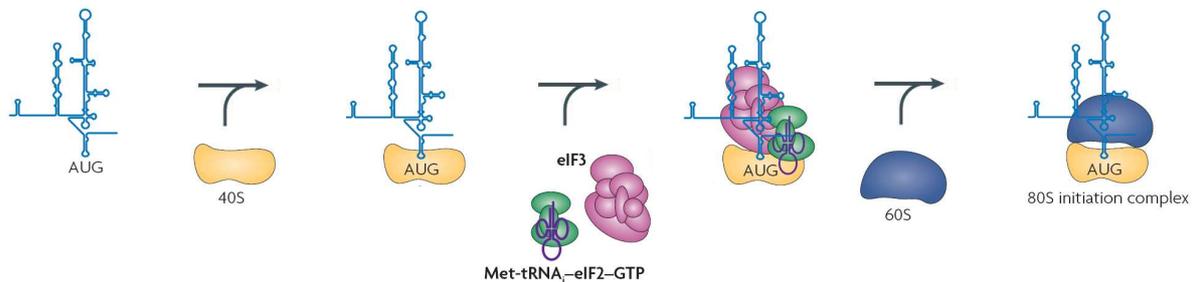


Figure 29 : Modèle de formation du complexe d'initiation de la traduction médiée par l'IRES du VHC (d'après Fraser and Doudna, 2007).

Même si l'activité de traduction du VHC ne nécessite pas l'implication de facteurs canoniques, de nombreuses études ont montré que des facteurs cellulaires et viraux peuvent interagir avec l'IRES et moduler son activité traductionnelle. Les facteurs

cellulaires décrits sont l'auto-antigène La (Ali *et al.*, 2000;Pudi *et al.*, 2004), la polypyrimidine tract-binding protein (PTB) (Anwar *et al.*, 2000) et la poly-C binding protein (Fukushi *et al.*, 2001). La régulation de la traduction du VHC implique également des facteurs viraux. L'expression de core inhibe spécifiquement la traduction du VHC du fait de sa liaison à un triplet GGG dans la tige-boucle IIIId de l'IRES (Shimoike *et al.*, 2006). Cette première observation est soutenue par d'autres études montrant qu'une petite séquence d'acides aminés (aa 34 à 44) dans la protéine core est importante pour sa liaison avec l'IRES (Zhang *et al.*, 2002). De plus, il a été démontré que vingt résidus du domaine N-terminal de la protéine core inhibent sélectivement la traduction médiée par l'IRES du VHC, de manière spécifique (Li *et al.*, 2003). Une autre étude montre que l'inhibition de la traduction pourrait également être due à une interaction ARN-ARN (Wang *et al.*, 2000).

La région 5'NTR ne contient pas seulement les régions déterminantes pour la traduction, mais aussi les éléments nécessaires à la réplication virale. En effet, cette région est la région complémentaire de la région 3' de l'intermédiaire de réplication viral de polarité négative (brin négatif). Ainsi, les séquences en amont de l'IRES mais également l'intégralité de la séquence 5'NTR sont essentielles pour la réplication de l'ARN viral (Astier-Gin *et al.*, 2005;Friebe and Bartenschlager, 2009). La tige-boucle du domaine II de l'IRES est également importante pour la réplication (Suzuki *et al.*, 2007).

4. Maturation de la polyprotéine

La traduction du génome viral donne naissance à une polyprotéine précurseur qui va être clivée, de manière co-et post-traductionnelle par des protéases cellulaires et virales, en protéines structurales et non structurales (Figure 30). Les protéines de structure E1, E2, et core ainsi que la protéine p7 sont clivées par la signal peptidase du RE alors que les protéines non structurales sont clivées par deux protéases virales, la protéase auto-catalytique NS2-3 et la protéase NS3-4A. Tous ces clivages ont lieu à la membrane du RE, à laquelle toutes les protéines du VHC vont se localiser (Figure 30).

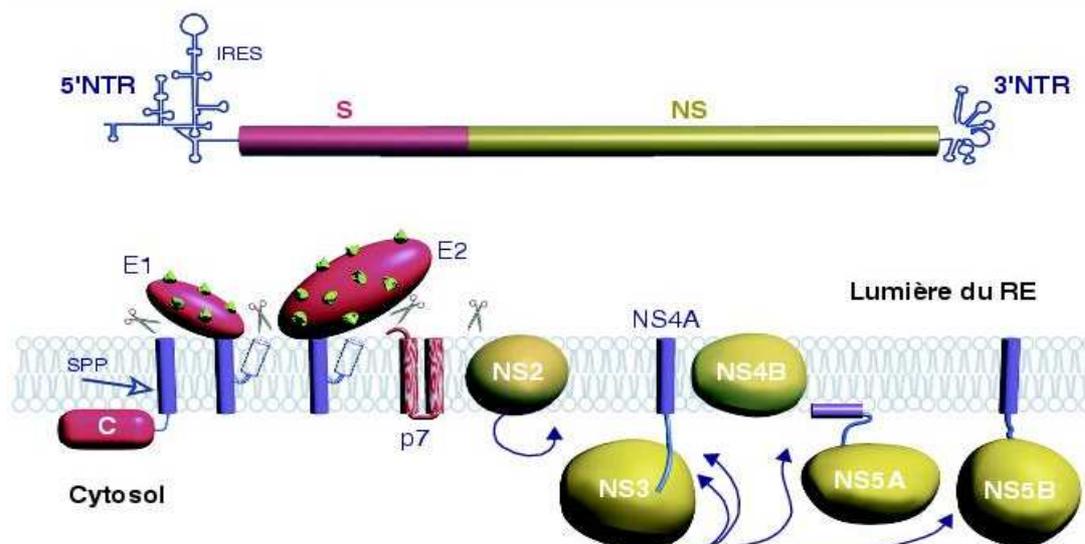


Figure 30 : Organisation du génome, maturation de la polyprotéine du VHC et localisation des protéines au niveau du RE (d'après Penin et al. 2004).

La flèche intramembranaire localise le site de clivage par la signal peptide peptidase (SPP). Les domaines transmembranaires des protéines E1 et E2 sont présentés après le clivage par la signal peptidase et réorientation des motifs hydrophobes C terminaux respectifs (rectangles avec des points). Les ciseaux indiquent les clivages effectués par la signal peptidase (SP) du RE ; la flèche cyclique, le clivage autocatalytique de la jonction NS2/NS3; les flèches sous NS3, les sites de clivage par la protéase NS3/NS4A. Les protubérances vertes représentent les sites de glycosylation des protéines d'enveloppe E1 et E2.

Les premiers clivages aux jonctions core-E1, E1-E2, E2-p7 et p7-NS2 sont réalisés par des signal-peptidases cellulaires (SP). La protéine core est séparée du signal peptide de E1 par une signal-peptide peptidase (SPP). Cette peptidase a été identifiée comme une protéase de type présénile aspartique, elle présente une activité protéase au niveau des membranes cellulaires entraînant une coupure des liaisons peptidiques dans le plan des bicouches lipidiques. Le clivage de la jonction NS2-NS3 est une réaction autocatalytique intramoléculaire rapide réalisé par la protéase NS2 et le domaine N-terminal de NS3. Par contre, les quatre autres jonctions sont clivées, sans doute de manière séquentielle, par une sérine protéase contenue dans les 180 résidus de la partie N-terminale de NS3, une fois celle-ci libérée de NS2 (Welbourn *et al.*, 2005).

5. Réplication de l'ARN viral

La maturation de la polyprotéine virale conduit à la libération des protéines structurales et non structurales permettant ainsi d'initier la réplication par la formation du complexe de réplication ou CR.

Comme d'autres virus à polarité positive, la réplication commence par la synthèse d'un ARN complémentaire de polarité négative. Puis ce brin néosynthétisé, de polarité négative, sert de matrice pour la synthèse d'un nouveau brin de polarité positive. Ces

deux étapes sont catalysées par une enzyme virale, une ARN-polymérase ARN-dépendante (RdRp), la NS5B. La protéine NS5B recombinante montre une activité RdRp *in vitro*, mais semble manquer de spécificité et de fidélité pour sa matrice, caractéristiques indispensables à une réplication virale fidèle. Ainsi, des facteurs cellulaires et/ou viraux sont nécessaires pour la réplication optimale de l'ARN du VHC et pour la formation d'un CR. Le CR se fixe à la membrane du RE, au niveau du réseau membranaire appelé "membranous web", structure particulière constituée de vésicules, dont la formation est dépendante de la protéine NS4B du virus (Figure 31).

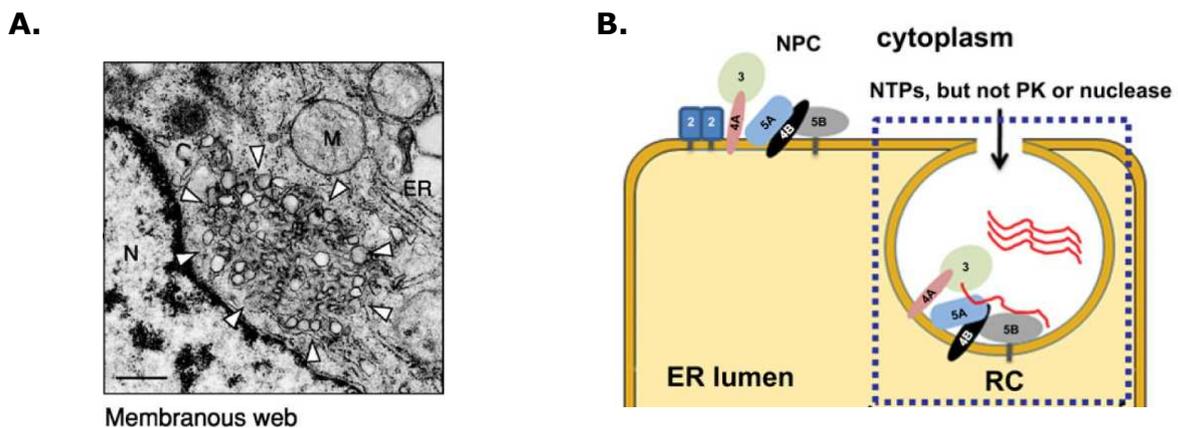


Figure 31 : Réseau membranaire siège de réplication du VHC et modèle de formation du CR du VHC (Gosert *et al.*, 2003 (ME);Tang and Grise, 2009).

(A) Le "membranous web" de cellules Huh7 répliquant un réplicon subgénomique du VHC vu par microscopie électronique. Barre=500nm ; N : Noyau ; ER : Réticulum Endoplasmique ; M : Mitochondrie. (B) Modèle de formation du complexe de réplication. Les CR, localisés dans des invaginations de la membrane du RE, sont protégés des protéinases K (PK) et des nucléases. RC : Complexe de Réplication ; NPC : Complexe des protéines non-structurales.

A ce jour, la composition précise du CR 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'ai pas, ce deuxième complexe est appelé complexe des protéines non-structurales (Miyanari *et al.*, 2003;Quinkert *et al.*, 2005). Ces deux fractions peuvent être discriminées par leur sensibilité différente à la protéinase K, après perméabilisation des cellules avec la digitonine (Figure 31). En effet, les protéines non structurales incorporées dans les CR sont protégées de la digestion par la protéinase K, alors que les autres sont dégradées (Quinkert *et al.*, 2005). Au regard de ces résultats, les auteurs suggèrent qu'un CR actif est composé, d'un ARN (-), de deux à dix ARN(+) et de plusieurs centaines de protéines non structurales, pouvant être des éléments structuraux nécessaire à la formation de compartiments vésiculaires qui sont les sites de la réplication du VHC (Figure 31). Le rôle de cette compartimentalisation n'est pas encore bien compris. Cela peut inclure un rôle (1) de support physique du CR, (2) de

concentration des protéines virales, localement, pour les rendre plus accessibles (3) d'amarrage de l'ARN viral, facilitant sa réplication (4) de réserve de lipides, important pour la réplication et (5) de protection de l'ARN viral contre les défenses cellulaires (Wolk *et al.*, 2008). Les grandes quantités de protéines non structurales non impliquées dans le CR, pourraient jouer un rôle dans la formation de particules virales infectieuses (Miyanari *et al.*, 2007).

De nombreux co-facteurs cellulaires régulent la réplication du VHC *in vitro* ; les miARNs (miR-122) (Jopling *et al.*, 2005), diverses protéines d'hôte interagissant avec les protéines non structurales et des composants de la voie des ARNs interférents (Randall *et al.*, 2007). Randall et collaborateurs ont montré, en utilisant un criblage par des ARNs interférents de cellules Huh7.5 répliquant le virus, que 26 gènes étaient importants pour la réplication du VHC et pour la production de particules virales infectieuses (Randall *et al.*, 2007). Les différents composants de la machinerie des ARNs interférences, le complexe DICER et les composants du complexe RISC, mais également miRNA122 doivent être fonctionnels pour que la réplication du VHC soit efficace. Ils ont également confirmés des études précédentes ayant montré que VAP-A et VAP-B modulent la réplication de l'ARN VHC via une interaction avec NS5A (Gao *et al.*, 2004; Hamamoto *et al.*, 2005). Un composé du cytosquelette d'actine, ACTN1, se fixe à NS5B et aidant ainsi la NS5B à se localiser dans le CR (Randall *et al.*, 2007). De nombreuses kinases, interagissant avec la protéine NS5A, telles PDPK1, RAF1, EIF2AK2 et GRB2, sont importantes pour la réplication du VHC, cependant leur rôle dans ce processus/mécanisme n'est pas encore clairement défini (Randall *et al.*, 2007).

Des études récentes ont révélé que la réplication de l'ARN du VHC et le métabolisme lipidique des hépatocytes sont étroitement liés. En culture cellulaire, la réplication de l'ARN du VHC peut être stimulée par des acides gras saturés et mono-insaturés, et inhibé par des acides gras poly-insaturés ou par l'inhibition de la synthèse des acides gras. Ces résultats soulignent l'importance de la fluidité des membranes pour la formation du réseau membranaire et pour le bon fonctionnement CR.

Il a été montré que la géranylgéranylation d'une ou plusieurs protéines de l'hôte est nécessaire pour la réplication du VHC (Kapadia and Chisari, 2005). Une de ces protéines géranylgéranylée, est la FBL-2, ancrée dans la membrane du RE. La FBL-2 contient un motif F-box servant dans le ciblage des protéines dans la voie de dégradation par le protéasome et interagit avec la protéine NS5A. L'utilisation d'inhibiteur de la géranylgéranylation (GGTI-286) inhibe la réplication (Ye *et al.*, 2003). Ainsi, FBL-2 pourrait être impliquée dans la dégradation des protéines inhibant la réplication (Wang *et al.*, 2005). La réplication de l'ARN du VHC est aussi dépendante de la voie du

mévalonate, puisque l'ajout d'inhibiteur de cette voie (lovostatine, fluvastatine) bloque la réplication (Ikeda *et al.*, 2006).

D'autres protéines cellulaires qui se lient aux protéines NS5A et NS5B sont également essentielles à la réplication, (Moriishi and Matsuura, 2007). Ainsi, les protéines associées aux membranes, VAP-A et -B, localisées au niveau des membranes du RE et de l'appareil de Golgi, semblent impliquées dans la formation d'un CR fonctionnel (Gao *et al.*, 2004; Hamamoto *et al.*, 2005).

Des études récentes ont identifié des facteurs d'hôte supplémentaires liés à la réplication du VHC ARN. Partant du constat que la cyclosporine A (CsA) inhibait la réplication de l'ARN du VHC *in vitro*, la cyclophiline B a été identifiée comme une cible de la CsA (Watashi *et al.*, 2005). La cyclophiline B est une peptidyl-prolyl cis-trans-isomérase. Il a été montré que la cyclophiline B interagit avec NS5B, stimulant ainsi son activité de liaison à l'ARN (Kaul *et al.*, 2009). Cette activité enzymatique a un rôle qui n'a pas encore été défini dans la réplication du VHC. Sur la base de ces constatations, les non-immunosuppresseurs analogues de la CsA sont actuellement en développement comme antiviraux contre l'hépatite C (Goto *et al.*, 2006; Paeshuyse *et al.*, 2006).

D'autres composants cellulaires qui se lient à l'ARN du VHC, comme la PTB, peuvent aussi être impliqués dans la réplication virale. La PTB a été observée comme modulant l'activité IRES du VHC, ainsi que faisant partie du CR et participant à la synthèse d'ARN viral.

De plus, l'état physiologique de la cellule peut avoir un effet important sur l'efficacité de la réplication. Confluence, pauvreté en nucléotides, changement de température et production de ROS (reactive oxidative species = radicaux libres induisant le stress oxydatif) sont autant de facteurs pouvant inhiber la réplication ou l'infection *in vitro* (Choi *et al.*, 2004; Nelson and Tang, 2006; Pietschmann *et al.*, 2001; Sainz, Jr. and Chisari, 2006; Stuyver *et al.*, 2003). Tous ces résultats suggèrent que la réplication du VHC, en culture cellulaire, est un processus sensible à l'environnement.

6. Assemblage et sécrétion des particules virales

Les ARNs du VHC produits vont soit servir à la synthèse de nouvelles protéines virales soit former des virions lors de l'étape d'assemblage qui seront ensuite sécrétés dans le milieu extracellulaire.

Les étapes tardives du cycle viral du VHC sont encore mal connues. L'assemblage est probablement déclenché par l'interaction entre l'ARN génomique et la protéine de capsid, qui aboutit à la formation de la nucléocapside par des mécanismes non encore élucidés (Roingard and Hourieux, 2008). En effet, aucun signal d'encapsidation n'a été identifié pour l'instant. Les virions semblent être formés par bourgeonnement dans le RE, ou dans un compartiment dérivé du RE, et ensuite sécrétés par exocytose.

Les particules VHC s'assemblent au niveau de la surface ou à proximité des gouttelettes lipidiques et l'assemblage et la sécrétion semblent être deux étapes étroitement liées à la synthèse et à la sécrétion des VLDL (Gastaminza *et al.*, 2008;Huang *et al.*, 2007a). 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 (pour une revue voir Popescu and Dubuisson, 2010).

6.1. Association des lipoprotéines et VHC

Depuis longtemps, le VHC a été décrit comme associé aux LDL et VLDL chez les patients infectés chroniques (Andre *et al.*, 2002;Nielsen *et al.*, 2006). En effet, les particules virales du VHC circulant dans le sang constituent une population hétérogène de virions ayant différentes densités variant entre 1,03 à 1,25g/mL, dont environ 40% ont une densité de 1,05 g/mL (Andre *et al.*, 2002;Nielsen *et al.*, 2006). Ces particules infectieuses sont riches en triglycérides, apoB, apoE, apoCII et possèdent les caractéristiques physico-chimiques des VLDL. Ces particules ont donc été appelées des lipo-viro-particules (LVP) (Andre *et al.*, 2005). Les anticorps anti-apoB et anti-apoE reconnaissent spécifiquement les LVP présents dans le sérum de patients infectés, suggérant une interaction entre VLDL et virions (Andre *et al.*, 2002;Nielsen *et al.*, 2006;Owen *et al.*, 2009).

Le développement d'un modèle permettant la production de particules infectieuses en culture cellulaire (VHCcc) a permis de corroborer ces observations *in vivo* avec les analyses de densité sur les particules produites *in vitro*. Dans le système VHCcc, l'infectiosité élevée est associée à une faible densité des particules sécrétées dans le milieu de culture tout comme les LVP isolées des sérums de patients (Gastaminza *et al.*, 2006). Les particules VHCcc intracellulaires moins infectieuses sont également moins denses que les particules sécrétées (Gastaminza *et al.*, 2006). Ces études suggèrent que les virus acquièrent leurs caractéristiques LVP, dans la cellule, en collaboration étroite avec la maturation des lipoprotéines avant leur sécrétion dans le milieu extracellulaire (Figure 32).

Récemment, il a été montré que les particules virales présentes dans les fractions de faible densité qui sont très infectieuses ont également un très grand pouvoir fusogène comparé aux particules de forte densité (Haid *et al.*, 2009).

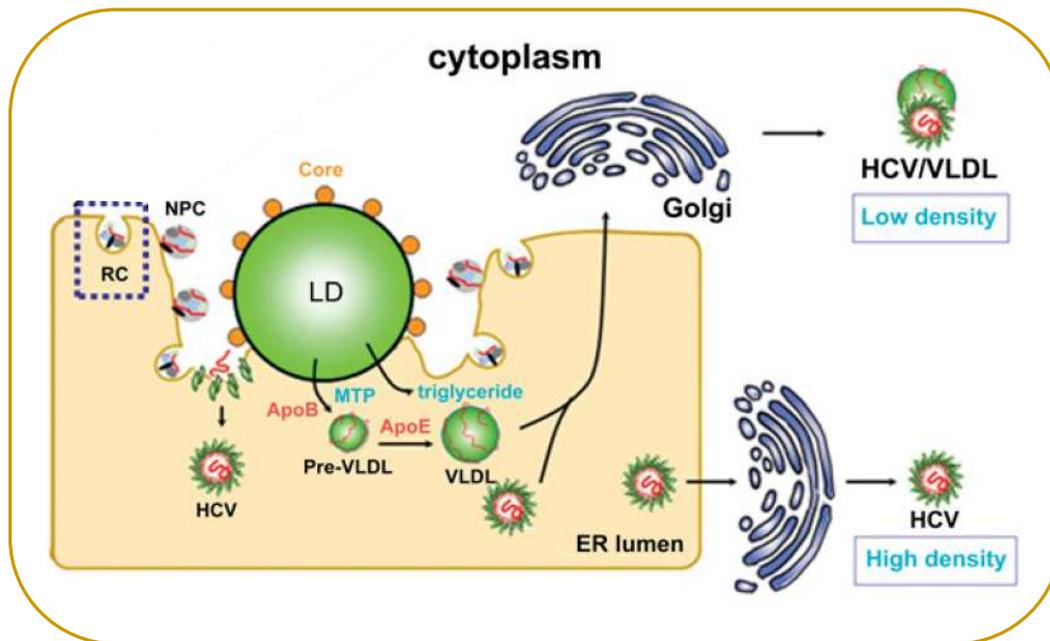


Figure 32: Modèle d'assemblage et de sécrétion des particules virales du VHC (d'après Tang and Gris  2009).

La protéine core s'associe aux gouttelettes lipidiques et interagit avec les complexes multiprotéiques formés par les protéines non-structurales (NPC) localisées à la surface du RE. Cet environnement, riche en gouttelettes lipidiques, est le lieu de formation des VLDL. La synthèse des particules virales infectieuses, de basse densité, se fait par cooptation de la voie de synthèse des VLDL. Les particules non associées aux VLDL, plus denses, sont également sécrétées mais ne seront pas infectieuses.

6.2. Rôle des gouttelettes lipidiques et des VLDL dans l'assemblage et sécrétion du VHC

Grâce au nouveau modèle VHCcc, permettant la production de particules infectieuses en culture cellulaire, de nombreuses équipes ont montré le rôle essentiel du métabolisme des lipides dans la production des virions.

Miyanari et al., ont démontré que les gouttelettes lipidiques constituent une plateforme essentielle pour l'assemblage des particules virales du VHC infectieuses (Miyanari *et al.*, 2007). Ils ont démontré que la protéine core associée aux gouttelettes lipidiques permet le recrutement de protéines non structurales du VHC. L'association de core et des gouttelettes lipidiques est dépendante du domaine 2 hydrophobe de la protéine de capsid, notamment les acides aminés 138 et 143 (Boulant *et al.*, 2007; Miyanari *et al.*, 2007; Shavinskaya *et al.*, 2007). Cette association est un déterminant majeur de l'assemblage et de la libération des virions (Boulant *et al.*, 2007; Shavinskaya *et al.*, 2007). De plus, il semblerait que l'attachement de la capsid aux gouttelettes lipidiques se fait après son clivage par la SPP, qui serait déterminant pour la production de particules infectieuses (Targett-Adams *et al.*, 2008).

Par des expériences d'imagerie, Miyanari et al., ont également montré que core se localise directement autour des gouttelettes lipidiques et la glycoprotéine E2 et NS5A se localisent dans les structures membranaires entourant les gouttelettes lipidiques (Miyanari et al., 2007).

La biogenèse des gouttelettes lipidiques est un processus complexe et pas encore bien défini. Plusieurs modèles sont proposés (pour une revue voir : Olofsson et al., 2008) mais le modèle le mieux décrit est une accumulation de lipides neutres (TG et ester de cholestérol) entre les feuillettes de la bicouche phospholipidique dans des sites spécifiques du RE. Après avoir atteint une masse critique les gouttelettes lipidiques naissantes bourgeonnent à partir du RE. Les gouttelettes lipidiques possèdent donc une monocouche dérivée de ces membranes pouvant contenir diverses protéines (PAT protéines, marqueurs des gouttelettes lipidiques), impliquées dans la lipogenèse, la stabilité et le transport des gouttelettes lipidiques (Olofsson et al., 2008).

Il a été montré que les LDs sont des structures mobiles et dynamiques se déplaçant dans la cellule en interagissant avec d'autres organites (mitochondries, endosomes, RE, Golgi) (pour une revue voir Murphy et al., 2009). Il est donc concevable d'imaginer que la dynamique des gouttelettes lipidiques peut être mise à profit par le VHC pour la production des particules virales infectieuses.

La protéine core, accumulée à la surface des gouttelettes lipidiques induit également une redistribution du centre organisateur des microtubules (Boulant et al., 2008). L'utilisation d'inhibiteurs perturbant le réseau des microtubules bloque la redistribution de core et induit une baisse de la production de virions (Boulant et al., 2008). Le fait de perturber la dynamique des gouttelettes lipidiques semble donc influencer l'assemblage et la sécrétion du VHC.

Des mutations dans les protéines NS5A, NS2 et NS3 n'affectant pas la réplication, peuvent bloquer la production des particules virales infectieuses, suggérant ainsi le rôle important de ces NS dans l'assemblage et/ou la libération des virions (Appel et al., 2008; Jirasko et al., 2008; Jones et al., 2007; Ma et al., 2008; Tellinghuisen et al., 2008a). En effet, des mutations dans le domaine I (Miyanari et al., 2007) et la délétion du domaine III de NS5A (Appel et al., 2008) n'interfère pas sur l'efficacité de la réplication, mais empêche la co-localisation de NS5A et core au niveau des gouttelettes lipidiques et donc la production de particules infectieuses. La phosphorylation de la Ser457, située dans le domaine III de NS5A, semble également être importante pour l'assemblage des particules infectieuses (Appel et al., 2008; Tellinghuisen et al., 2008a).

Puisque la majorité des triglycérides incorporés dans les particules VLDL sont dérivées de gouttelettes lipidiques, il est possible que cette redistribution des LD à proximité des sites de réplication du VHC augmente les chances d'associer les particules de VHC en formation avec les VLDL. De plus, ceci pourrait empêcher l'assemblage des

VLDL en perturbant la disponibilité des gouttelettes lipidiques, la principale source de lipides nécessaires à la synthèse des VLDL (Boulant *et al.*, 2008).

Il a été récemment démontré que les apolipoprotéines (apo) peuvent être associées aux virions et que les membranes associées au CR contenant au moins trente pour cent de protéines impliquées dans le métabolisme lipidique (Huang *et al.*, 2007a). En utilisant des inhibiteurs de la MTP et des siARN dirigés contre apoB, deux équipes ont montré que la sécrétion des VLDL est nécessaire pour la production de particules virales infectieuses (Gastaminza *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2007a). De plus, en inhibant apoE la production de particules VHC est réduite suggérant qu'apoE, essentielle à la synthèse de VLDL mature, est également nécessaire à la production de particules infectieuses. Elle est d'ailleurs associée à la surface des particules produites (Chang *et al.*, 2007). L'assemblage et la sécrétion des particules virales semblent donc se faire par co-optation de la voie de synthèse des VLDL. Récemment, il a été montré que les glycoprotéines E1 et E2 exprimés dans des cellules HepG2 et Caco-2, en contexte non viral, sont efficacement sécrétées dans le milieu extracellulaire associées aux VLDL (Icard *et al.*, 2009). Ainsi, il apparaît que les protéines d'enveloppe ont une capacité intrinsèque d'utiliser la machinerie de synthèse des VLDL, même en absence des autres protéines du VHC.

6.3. La stéatose associée au VHC et métabolisme lipidique

L'infection par le VHC induit des changements dans l'homéostasie des lipides, assurant ainsi un microenvironnement riche en lipides et pouvant conduire à la stéatose (Syed *et al.*, 2009). En effet, la stéatose se retrouve chez plus de 50% des patients infectés chroniques. Cela peut être due à des facteurs métaboliques de l'hôte tels le diabète, l'obésité, l'alcoolisme ou l'hyperlipidémie ou cela peut être due à l'infection par le génotype 3 (Negro and Sanyal, 2009). Cependant la régulation du métabolisme lipidique de l'hôte par le VHC n'apparaît pas être entièrement spécifique du génotype (Syed *et al.*, 2009). L'infection par le VHC agit sur les deux côtés de la balance homéostatique des lipides. L'infection augmente la lipogénèse via l'activation des SREBP (sterol regulatory element binding proteins) et réduit l'exportation du cholestérol et des β -lipoprotéines dans le sang (Negro and Sanyal, 2009; Syed *et al.*, 2009). Les SREBP sont des facteurs de transcription associés au RE. Il existe trois isoformes des SREBP (SREBP-1a, SREBP-1c et SREBP-2) qui activent les gènes codant les enzymes, tel que FAS (fatty acid synthase), impliqués dans la biosynthèse des acides gras et du cholestérol (Horton *et al.*, 2002). L'inhibition des protéines SREBP ou FAS inhibe la réplication (Su *et al.*, 2002) et le relargage des virus (Yang *et al.*, 2008a). Sous l'effet du traitement antiviral, les taux de cholestérol et des β -lipoprotéines se normalisent, suggérant que le VHC est responsable de ces altérations (Negro and Sanyal, 2009). L'oxydation des acides gras et

l'export des lipides sont diminués à cause de la peroxydation des protéines et des lipides par les ROS, qui résultent du stress oxydatif induit par l'infection VHC (Okuda *et al.*, 2002; Syed *et al.*, 2009). De plus, les patients infectés par le VHC et atteints de stéatose présentent des taux anormalement bas d'ARNm PPAR α (peroxisome proliferator-activated receptor α) dans leur foie (Syed *et al.*, 2009). Ces PPAR α sont fortement exprimés dans les hépatocytes et ils régulent positivement les gènes impliqués dans la β -oxydation et le transport des acides gras.

OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE

A partir de 2005, l'établissement d'un nouveau modèle d'étude du VHC permettant la production de particules virales infectieuses en culture cellulaire appelé VHCcc a rendu possible l'étude du cycle viral complet du VHC (Lindenbach *et al.*, 2006; Wakita *et al.*, 2005; Zhong *et al.*, 2005). L'objectif de mon travail de thèse a été d'étudier deux étapes clés du cycle viral : l'entrée et l'assemblage/sécrétion afin de définir de nouvelles cibles thérapeutiques pour combattre le VHC. Ces deux études ont été menées en parallèle.

Durant la première partie du manuscrit, nous présentons une étude du rôle d'une protéine hépatique, l'apolipoprotéine E (apoE) dans l'assemblage et la sécrétion de particules virales infectieuses du VHC. En effet, des études antérieures réalisées au laboratoire ont montré que cette protéine hépatique interagissait avec la protéine virale NS5A. Nous avons poursuivi nos investigations en étudiant le rôle d'apoE dans le cycle viral. Les résultats obtenus sont décrits sous forme d'article dans la partie I des résultats.

Dans la deuxième partie du manuscrit, nous présentons les résultats obtenus lors de l'étude du rôle de la protéine claudin1 (CLDN1) dans l'étape d'entrée du virus dans sa cellule hôte. L'entrée du virus dans la cellule hôte est un processus complexe faisant intervenir différentes molécules. Les virus circulants associés aux LDL et VLDL, appelés lipo-viro particules (Andre *et al.*, 2002) s'attachent aux récepteurs des LDL ainsi qu'aux GAGs via les glycoprotéines d'enveloppe du virus. Cette étape permet de concentrer les virus à la surface de la cellule et initie la reconnaissance du VHC avec ses récepteurs spécifiques. La tétraspanine CD81 et le scavenger receptor BI (SR-BI) ont été les premiers récepteurs identifiés (pour une revue voir Zeisel *et al.*, 2009). Plus récemment, l'importance des protéines de jonction, CLDN1 (Evans *et al.*, 2007) et occludin (OCLN) (Liu *et al.*, 2009b; Ploss *et al.*, 2009) dans l'entrée du VHC a également été démontrée. Afin de contribuer à la compréhension des mécanismes d'entrée du virus dans la cellule mais également de définir de nouvelles cibles thérapeutiques sous forme d'inhibiteurs d'entrée, nous avons produits des anticorps anti-CLDN1 et après les avoir caractérisés, nous les avons utilisés pour étudier le rôle de cette protéine dans l'entrée virale en comparaison aux récepteurs CD81 et SRB1 déjà étudiés par diverses équipes dont la notre. Le travail décrivant ces résultats est présenté sous forme d'article dans la partie II des résultats.

RESULTATS

Article 1 : L'apolipoprotéine E interagit avec la protéine non-structurale NS5A du VHC et est requise pour l'assemblage des particules virales infectieuses

Au cours de travaux précédents mon arrivée au laboratoire, J. Benga avait identifié, en utilisant le système double hybride dans la levure, qu'une protéine cellulaire du métabolisme lipidique, apoE, pouvait interagir spécifiquement avec la protéine virale NS5A. Cette observation a été confirmée ensuite par des expériences de co-immunoprécipitation et d'immuno-localisation dans des cellules hépatocytaires répliquant le VHC de souche 2a. Nous avons de plus, obtenu des co-immunoprécipitations NS5A-apoE avec un génome viral de la souche 1b. A partir de ces données, notre but était de comprendre à quel moment du cycle viral apoE pouvait intervenir. Pour cela, nous avons dans un premier temps co-électroporé des cellules Huh7.5.1 avec des siARN apoE et de l'ARN viral Luc-Jc1. Le génome viral Luc-Jc1 code une chimère virale constituée d'une fusion des protéines structurales du génome J6 de génotype 2a et des protéines non structurales du génome viral JFH1 de génotype 2a en plus d'un gène rapporteur, le gène de la luciférase (Luc). Ce type de virus recombinant, codant le gène de la luciférase, permet de suivre aisément d'une part, la réplication virale dans les cellules électroporées, mais également l'infectivité des virions produits après infection de cellules Huh7.5.1 naïves. Trois jours suivant l'électroporation, les surnageants sont récoltés et testés pour leur capacité à infecter des cellules Huh7.5.1 naïves. En testant la capacité à répliquer le VHC de ces cellules électroporées avec des siApoE nous avons montré qu'apoE n'était pas impliquée dans la réplication, mais dans la production de particules virales infectieuses. Il a été montré récemment que, la protéine virale NS5A joue non seulement un rôle important dans la réplication virale (Tellinghuisen *et al.*, 2008b), mais également dans la production de particules virales infectieuses (Appel *et al.*, 2008). Afin de tester si l'interaction entre NS5A et apoE que nous avons observée pouvait être nécessaire à la production de particules virales infectieuses, nous avons testé, dans le système double hybride de levure, la capacité de mutants NS5A délétères pour la production de particules infectieuses (Appel *et al.*, 2008) d'interagir avec apoE. Nous avons ainsi pu montrer que ces mutations altéraient l'interaction de ces protéines, confirmant un rôle important de cette interaction dans le mécanisme de production de particules virales infectieuses.

Parallèlement, différents laboratoires ont montré que l'assemblage du VHC est étroitement lié à la synthèse des VLDL (Chang *et al.*, 2007;Huang *et al.*, 2007a). Bien que nous ayons observé un effet drastique d'apoE sur la production de particules virales, nos expériences préliminaires ne permettaient pas de savoir si apoE agissait sur l'assemblage des particules virales ou sur la sécrétion de ces dernières. Afin de tenter de distinguer ces deux étapes, nous avons défini différents protocoles utilisant le système VHCcc et des siApoE. Nous avons ensuite purifié les particules virales produites dans les surnageants de culture et celles présentes dans les lysats cellulaires. Ces particules ont ensuite été testées pour leur infectivité sur des cellules Huh7.5.1 naïves. A l'issue de ces

expériences, nous proposons un modèle dans lequel apoE joue un rôle d'une part dans l'assemblage des particules virales infectieuses et d'autre part dans la sécrétion des particules virales infectieuses.

Apolipoprotein E Interacts with Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5A and Determines Assembly of Infectious Particles

Wagane J. A. Benga,^{1,2*} Sophie E. Krieger,^{1,2*} Maria Dimitrova,^{1,2*} Mirjam B. Zeisel,^{1,2} Marie Parnot,^{1,2} Joachim Lupberger,^{1,2} Eberhard Hildt,³ Guangxiang Luo,⁴ John McLauchlan,⁵ Thomas F. Baumert,^{1,2,6} and Catherine Schuster^{1,2}

Chronic hepatitis C virus (HCV) infection is a major cause of liver disease worldwide. Restriction of HCV infection to human hepatocytes suggests that liver-specific host factors play a role in the viral life cycle. Using a yeast-two-hybrid system, we identified apolipoprotein E (apoE) as a liver-derived host factor specifically interacting with HCV nonstructural protein 5A (NS5A) but not with other viral proteins. The relevance of apoE–NS5A interaction for viral infection was confirmed by co-immunoprecipitation and co-localization studies of apoE and NS5A in an infectious HCV cell culture model system. Silencing apoE expression resulted in marked inhibition of infectious particle production without affecting viral entry and replication. Analysis of particle production in liver-derived cells with silenced apoE expression showed impairment of infectious particle assembly and release. The functional relevance of the apoE–NS5A interaction for production of viral particles was supported by loss or decrease of apoE–NS5A binding in assembly-defective viral mutants. **Conclusion: These results suggest that recruitment of apoE by NS5A is important for viral assembly and release of infectious viral particles. These findings have important implications for understanding the HCV life cycle and the development of novel antiviral strategies targeting HCV–lipoprotein interaction. (HEPATOLOGY 2010;51:43-53.)**

Hepatitis C virus (HCV) is a major cause of liver disease, including liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma.¹ Current treatment by interferon-alpha and ribavirin is limited by resistance, toxicity, and high costs.^{1,2} Novel treatment approaches are therefore urgently needed. HCV is an enveloped

single-stranded RNA virus of positive polarity that is a member of the genus *Hepacivirus* within the family *Flaviviridae*.^{3,4} The HCV RNA genome encodes a unique polyprotein of approximately 3000 amino acids and is flanked at its 5' and 3' ends by two highly conserved untranslated regions involved in the transla-

Abbreviations: apoE, apolipoprotein E; HCV, hepatitis C virus; HCVcc, cell culture-derived HCV; IgG, immunoglobulin G; MOI, multiplicity of infection; NS5A, nonstructural protein 5A; PBS, phosphate-buffered saline; PCR, polymerase chain reaction; siApoE, small interfering apolipoprotein ERNA; siRNA, small interfering RNA; VLDL, very-low-density lipoprotein; TCID50, 50% tissue culture infectious dose.

From ¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) Unite 748, Strasbourg, France; the ²Institut de Virologie, Université de Strasbourg, Strasbourg, France; ³Institut für Infektionsmedizin, Molekulare Medizinische Virologie, Kiel, Germany; the ⁴Department of Microbiology, Immunology and Molecular Genetics, University of Kentucky College of Medicine, Lexington, KY; the ⁵MRC Virology Unit, Glasgow, UK; and ⁶Pôle Hépatogastro-entérologie, Hôpital Civil, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France.

*These authors contributed equally to this work.

Received May 5, 2009; accepted August 30, 2009.

Supported by Inserm, France, the European Union (LSHM-CT-2004-503359, ERC-2008-AdG-233130-HEPCENT and INTERREG IV "Hepato-Regio-Net"), the Chair of Excellence Program of the Agence Nationale de la Recherche (ANR-05-CEXC-008), France, the Agence Nationale de la Recherche sur le SIDA et les Hépatites Virales (ANRS-06221 and 2008/354), France, the FRM-BNP Paribas Foundation, Paris, France, the CONECTUS programme of the University of Strasbourg, France, and the Else-Kröner-Fresenius Foundation (P17/07//A83/06), Bad Homburg, Germany.

Address reprint requests to: Dr. Catherine Schuster, Ph.D., Inserm U748, 3 rue Koeberlé, F-67000 Strasbourg, France. E-mail: catherine.schuster@unistra.fr; fax: (33)-3-68-85-37-24; and Prof. Thomas F. Baumert, M.D., Inserm U748, 3 rue Koeberlé, F-67000 Strasbourg, France. E-mail: Thomas.Baumert@unistra.fr; fax: (33)-3-68-85-37-50.

Copyright © 2009 by the American Association for the Study of Liver Diseases.

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

DOI 10.1002/hep.23278

Potential conflict of interest: Nothing to report.

tion and replication processes of the virus, respectively. The virus enters the cell through interaction of the viral glycoproteins with cellular co-factors.^{3,4} After viral entry, viral translation and replication occurs in a cell compartment termed the “membranous web,” which is followed by viral assembly and particle egress.^{3,4}

An important feature of the hepatocyte is its key role in lipid metabolism. Increasing evidence suggests that the HCV life cycle and hepatocyte lipid metabolism pathways are closely linked. Indeed, HCV replication takes place, as noted previously, at specialized rearranged intracellular membranes termed “membranous web.”⁴ Membrane vesicles containing the HCV replication complex have been shown to be highly enriched in proteins required for very-low-density lipoprotein (VLDL) assembly, including apolipoprotein B (apoB), apolipoprotein E (apoE), and microsomal triglyceride transfer protein.⁵ Furthermore, the VLDL pathway has been shown to play a role in the assembly and maturation of infectious viral particles.^{5,6} Moreover, a hepatocyte organelle storing lipids—the lipid droplet—has been shown to be important for the production of infectious virus particles.^{7,8} Miyanari and colleagues⁸ demonstrated that the viral capsid protein core recruits viral nonstructural proteins and replication complexes to lipid droplet-associated membranes, and that this recruitment is critical for producing infectious viruses. Furthermore, HCV core protein has been shown to induce lipid droplet redistribution,⁹ and different HCV genotype core sequences have been shown to induce morphological changes in intracellular lipid droplets.¹⁰ Finally, Chang et al.¹¹ have shown that HCV infectious virions purified from low-density fractions of cell culture supernatants are assembled as apoE-enriched lipoprotein particles and can be specifically precipitated by anti-apoE and anti-E2 monoclonal antibodies.¹¹ These findings indicate that apoE is required for HCV virion infectivity and production. However, how apoE is recruited to the infectious particle and which viral factors are implicated in that interaction process remain unclear.

Recent evidence suggests that the viral nonstructural protein 5A (NS5A) plays an important role in HCV virion production. NS5A was found to be recruited by core-associated lipid droplets in replicating Huh7.5 cells for production of infectious particles.^{8,12} The introduction of specific mutations into the NS5A showed that mutations in NS5A C-terminal domain III abolished core-NS5A colocalization in the HCV-replicating cells and hampered virion production.^{8,13} These data identify NS5A as a viral factor for assembly of infectious viral particles.^{8,13} However, the functional link between NS5A and virus production is unknown.

Materials and Methods

Plasmids. Yeast two-hybrid system expression plasmids have been described.¹⁴ The full-length apoE complementary DNA cloned in pOTB7 vector was purchased from Open Biosystems and contains an apoE consensus sequence. After digestion of the plasmid by EcoRI-XhoI apoE, complementary DNA was inserted in the EcoRI-XhoI sites of a yeast plasmid expressing the activation domain of Gal4 (pGADT7). Plasmids pFK-Jc1 (Jc1), pFK-Luc-Jc1 (Luc-Jc1) and J6/JFH1 constructs have been described.¹⁵⁻¹⁹ JFH1 or H77 NS5A encoding regions were polymerase chain reaction (PCR) amplified using Jc1 or p90/HCV FL-long pU²⁰ as templates and inserted in the pGBKT7 EcoRI-SalI sites.¹⁴ Alanine triplet substitutions at positions 99 to 101 and 102 to 104 in the JFH1 NS5A coding region as described by Miyanari et al.⁸ and “domain III” deletion mutant described by Appel et al.¹³ were obtained as described recently.²¹

Yeast Strains. The pGADT7 plasmid expressing a fusion between the activation domain of Gal4 and ApoE and the pGBKT7 plasmids expressing fusions between the DNA binding domain of Gal4 and the HCV nonstructural proteins were transformed in the *S. cerevisiae* strain AH109 (MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2:GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2, URA3:MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ).

Antibodies. Monoclonal mouse anti-NS5A was obtained from Virostat. Rabbit polyclonal anti-NS5A,²² and monoclonal anti-apoE (Ab23, Ab33) have been described,¹¹ polyclonal rabbit anti-apoE were from Epitomics and Abgent, and polyclonal rabbit anti-apoA1 was from Santa Cruz.

Yeast Two-Hybrid Assays. Yeast two-hybrid assays were performed as described by Dimitrova et al.¹⁴ The pGBKT7-derived and pGADT7-derived constructs encoding apoE or HCV nonstructural proteins were co-transformed into AH109 yeast cells. Co-transformants were grown for approximately 24 hours in –LEU –TRP medium and then spotted onto –LEU –TRP culture plates to select for co-transformants and onto –TRP –LEU –HIS –ADE culture plates to allow for selection of interactants.

RNA Interference Assay. Commercially available small interfering RNAs (siRNA) pools targeting apoE and apoA1 as well as control nontargeting siRNAs were purchased from Dharmacon and transfected into Huh7.5.1 cells using DharmaFect solution following the manufacturer’s protocol. Silencing of protein expression was assessed by immunoblotting¹⁹ for apoE or immunofluorescence¹⁴ for apoA1.

Production of HCV Pseudotype Particles and Infection of Huh7.5.1 Cells. Production and infection of Huh7.5.1 cells using murine leukemia virus (MLV)-based HCV pseudotype particles (HCVpp) (strain H77) were performed as described.^{19,23,24}

Analysis of HCV Infection and Replication. For the study of the viral life cycle in cells with silenced apoE expression, siRNAs were either co-electroporated with HCV Luc-Jc1 RNA^{16,19} (protocol A) or transfected 3 days before electroporation of HCV RNA (protocol B). HCV replication was analyzed by luciferase activity as described.^{15,19} For infection assays, Huh7.5.1 cells were incubated with Luc-Jc1 cell culture-derived HCV (HCVcc) (50% tissue culture infectious dose (TCID₅₀) of 10³, 10⁴, and 10⁵/mL, corresponding to a multiplicity of infection [MOI] of 0.1, 1, and 10). Forty-eight hours later, infection was analyzed by quantitation of protein expression using luciferase activity.^{15,16,19}

Purification of Intracellular or Extracellular HCV Virions Using Sucrose Gradient Ultracentrifugation. HCV virions were partially purified by pelleting lysates or culture supernatants through a sucrose cushion (20% sucrose in TN buffer) using a SW55Ti rotor (100 000 g for 4 hours at 4°C) and a Beckman L8-80M preparative ultracentrifuge. In addition, HCV RNA of cell lysates and supernatants were purified on iodixanol gradients as described by Gastaminza et al.²⁵ Viral RNA content was determined by quantitative reverse transcription PCR, and infectivity was assessed by incubation of pelleted HCV or iodixanol gradient fractions with naïve Huh7.5.1 cells and subsequent detection of infection (72 hours after incubation) by luciferase activity.

Co-immunoprecipitation of apoE and NS5A in HCV Replicating Cells. Co-immunoprecipitation experiments were performed in Huh7.5.1 cells containing replicating Jc1 as described,¹⁴ using monoclonal anti-NS5A (Virostat) or an anti-c-myc-tag isotype control antibody (Sigma). Immunoprecipitated proteins were subjected to immunoblotting using monoclonal anti-apoE.¹¹ In a second approach, co-immunoprecipitation was performed in lysates of Huh7.5.1 cells transfected with HCV J6/JFH1 RNA¹⁷ or Huh9-13 cells containing the HCV Con-1 replicon,²⁶ using rabbit anti-NS5A,²² anti-apoE (Abgent), or an anti-HBc control antibody²⁷ and a previously described co-immunoprecipitation protocol.²⁸ Immunoprecipitated proteins were analyzed by immunoblotting using peroxidase-conjugated apoE and anti-NS5A (Peroxidase conjugation kit, Pierce).

Co-localization of apoE and NS5A in HCV Replicating and Infected Cells. Huh7.5.1 cells containing Jc1 HCV RNA were fixed with 3% paraformaldehyde/phosphate-buffered saline (PBS) and permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS. Proteins were stained using

anti-apoE (Epitomics), anti-NS5A (Virostat), and Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin G (IgG) and Alexa Fluor 568-conjugated goat anti-mouse IgG (Molecular Probes) and a Zeiss Axiovert microscope (Zeiss). Immunofluorescence and confocal laser scanning microscopy of Huh7.5.1 cells infected with HCV JFH-1 or Jc1 was performed as described.²⁹

Results

ApoE Interacts with the HCV NS5A Protein in a Yeast Two-Hybrid Assay. To investigate apoE-HCV interactions, we first studied the interaction of apoE with HCV proteins using a yeast two-hybrid system. A yeast two-hybrid assay was constructed using HCV proteins fused to Gal4 DNA binding domain as bait and a full-length apoE fused to the Gal4 activation domain as a prey. After viral protein–apoE interaction, reporter gene His3 is activated, allowing selection on defined media (Fig. 1A). As shown in Fig. 1, only yeast co-transformed with apoE and HCV NS5A protein was able to grow on selective media (Fig. 1B). The specificity of this interaction for NS5A was confirmed by the absence of growth in co-transformation experiments using the HCV core and nonstructural proteins NS2, NS3, NS4A, NS4B, and NS5B and nonrelated nonviral proteins (Fig. 1B). Interestingly, an apoE interaction was not observed with C-terminally truncated envelope glycoproteins E1 (aa 170-311) and E2 (aa 371-661) (data not shown). The binding of apoE to NS5A appeared to be conserved among different genotypes because both NS5A of strain H77 as well as NS5A derived from strain JFH1 bound to apoE in the yeast two-hybrid system (Fig. 8A). The validity of the yeast two-hybrid system for the study of viral protein–protein interactions was further confirmed by core–NS5A interaction of both strains H77 and JFH1 (Fig. 1C), which has been shown to be required for viral assembly.^{8,13} These results demonstrate that HCV NS5A interacts specifically with full-length apoE in a yeast two-hybrid assay.

ApoE and NS5A Co-immunoprecipitate and Co-localize in Huh7.5.1 Cells Containing Replicating HCV. To confirm binding of host factor apoE and viral protein NS5A during the HCV life cycle, we performed co-immunoprecipitation experiments in Huh7.5.1 cells containing replicating HCV. Anti-NS5A antibody specifically co-immunoprecipitated viral protein NS5A together with apoE (Fig. 2). Detection of apoE–NS5A binding was dependent on the concentration of anti-NS5A antibody, because low concentrations of anti-NS5A antibody did not allow detection of apoE–NS5A binding. The validity of the results was further confirmed

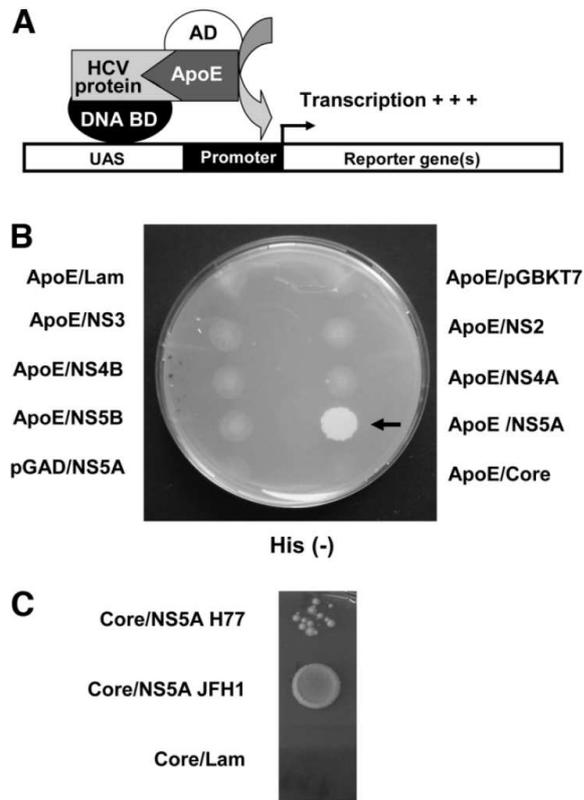


Fig. 1. Interaction of apoE with HCV NS5A protein in a yeast two-hybrid assay. (A) Principle of the yeast two-hybrid screen: In this system, interaction between two proteins is indicated by the activation of the reporter gene HIS3, which allowed growth on histidine-depleted (HIS⁻) plates. (B) AH109 yeasts (matchmaker Clontech) were co-transformed with a plasmid encoding a fusion of the apoE coding region and the activation domain of Gal 4 and plasmids encoding the fusion of the DNA binding domain of Gal4 and HCV H77 strain proteins (core, NS2, NS3, NS4B, NS5A, and NS5B) or control protein laminin (Lam) or the Gal4 DNA activation domain only (pGBKT7). After 2 weeks at 30°C on selective His⁻ media, yeast growth was analyzed. (C) AH109 yeasts (matchmaker Clontech) were co-transformed with a plasmid encoding a fusion of HCV core protein and the activation domain of Gal4 and plasmids encoding the fusion of DNA binding domain of Gal4 and NS5A from H77 or JFH1 strains or control protein Lam.

by absence of immunoprecipitation of apoE using anti-NS5A antibody in non-HCV-replicating Huh7.5.1 cells (Fig. 2A). ApoE-NS5A interaction was further confirmed by reciprocal co-immunoprecipitation using anti-apoE (Fig. 2B, C). Furthermore, apoE-NS5A interaction appeared to be genotype-independent, because it was also easily observed for NS5A of the HCV genotype 1b Con-1 replicon (Fig. 2B, C). These results clearly demonstrate that HCV protein NS5A binds to host cell apoE in target cells with replicating HCV. The detection of apoE-NS5A binding by co-immunoprecipitation did not require over-expression of apoE or NS5A using complementary DNA

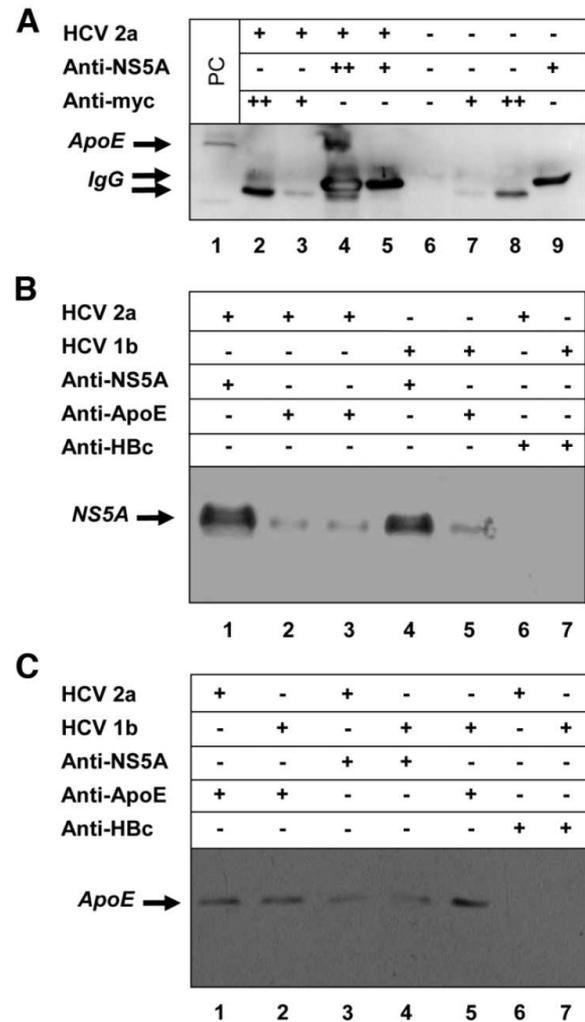


Fig. 2. Co-immunoprecipitation of apoE and HCV NS5A protein in HCV replicating Huh7.5.1 cells. (A) Full-length replication-competent HCV RNA derived from isolate HCV Luc-Jc1 was transfected into the hepatoma cell line Huh7.5.1. Seventy-two hours after transfection, Huh7.5.1 cells containing replicating HCV were lysed and subjected to immunoprecipitation using a monoclonal anti-NS5A or an unrelated control monoclonal anti-myc antibody as described in Materials and Methods. As a positive control (PC), apoE expression was analyzed in Huh7.5.1 lysates shown in lane 1. Proteins immunoprecipitated by anti-NS5A or anti-myc control antibody ("++" corresponds to an antibody concentration of 15 µg/mL, "+" to 7.5 µg/mL) were analyzed by immunoblot using anti-apoE antibody 33 (1/500) and horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse secondary antibody. (B, C) Reciprocal co-immunoprecipitation of NS5A of genotype 1 and 2 in HCV replicating cells. Huh7 cells containing replicating HCV Con1 (genotype 1b) or JFH1/J6 (genotype 2a) were lysed and subjected to immunoprecipitation using anti-NS5A, anti-apoE, or anti-HBc as an unrelated control antibody. Immunoprecipitated proteins were analyzed by immunoblot using peroxidase-conjugated anti-NS5A and anti-apoE antibodies. Peroxidase conjugation of anti-apoE and anti-NS5A antibodies in immunoblot analysis shown in panels (B) and (C) eliminated detection of cross-reacting light and heavy chains of the immunoprecipitating antibodies. PC, positive control.

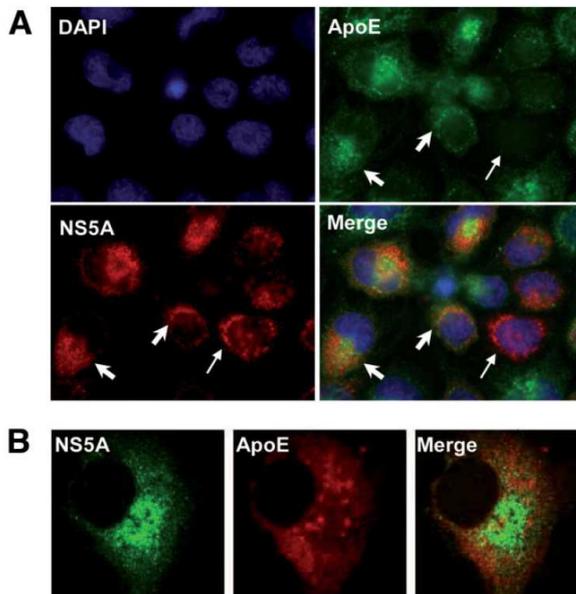


Fig. 3. Co-localization of apoE with HCV NS5A in Huh7.5.1 cells containing replicating HCV. (A) Co-localization of apoE and NS5A in Jc1 replicating cells. Full-length replication-competent HCV RNA derived from isolate Jc1 was transfected into the hepatoma cell line Huh7.5.1 cells as described in Materials and Methods. Seventy-two hours later, cells were fixed and stained for apoE and NS5A expression using rabbit anti-apoE antibody and Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit IgG (green fluorescence) and anti-NS5A antibody and Alexa Fluor 568-conjugated goat anti-mouse IgG (red fluorescence) as described in Materials and Methods. Nuclei were stained in blue (DAPI; left upper panel). Co-localization of stained proteins is shown in the right lower panel. (B) Confocal laser scanning microscopy of Huh7.5.1 cells infected with HCV JFH-1 (TCID50 10^4 /mL). Infection and staining of apoE and NS5A was performed as described in Materials and Methods.

expression constructs but was easily detectable with endogenous apoE present in physiological levels in hepatoma cells and NS5A in expression levels present during viral replication.

To further confirm apoE–NS5A binding during viral infection, we performed co-localization studies in HCV replicating and infected cells. As shown in Fig. 3A, Huh7.5.1 expressed apoE at various levels, including cells with high-level expression and cells in which expression of apoE was virtually absent. Confirming the interaction of NS5A with apoE in living cells, NS5A partially co-localized with apoE in Huh7.5.1 cells containing replicating HCV (Fig. 3A). This partial co-localization between apoE and NS5A was also observed at distinct “dot”-like structures in HCV-infected cells (Fig. 3B).

ApoE Is Required for Production of Infectious HCV Particles. To investigate the role of apoE and the impact of apoE–NS5A interaction on the HCV life cycle, we silenced apoE expression in Huh7.5.1 cells using apoE-specific siRNAs (siApoE). As shown in immunoblot anal-

yses, transfection of siApoE reproducibly and specifically silenced apoE expression (Fig. 4A). Using this protocol, we investigated whether silencing apoE had any impact on production of infectious viral particles. As shown in Fig. 4B, supernatants obtained from donor cells containing replicating HCV Jc1 with silenced apoE expression (siApoE) showed markedly reduced or total lack of infectivity. To confirm these results, we investigated the impact of apoE silencing in single-cycle infection experiments in a protocol similar to previous studies analyzing the impact of apoB on HCV production.⁶ Again, apoE silencing resulted in marked inhibition of infectivity of supernatants of infected cells (Fig. 4C). Inhibition of virus production was observed for different MOIs (0.1, 1, and 10), with the most pronounced inhibition occurring at the lowest MOI (Fig. 4C). These single-cycle experiments using infectious recombinant HCV at different MOIs confirm that apoE is required for production of infectious virions.

A previous report has described an interaction of NS5A with apoA1 using co-immunoprecipitation experiments.³⁰ As shown in Fig. 4B, silencing of apoA1 by a pool of validated siRNAs did not result in detectable decrease of virus production.

ApoE Is a Host Factor Required for a Late Stage in the Viral Life Cycle. Next, we mapped the stage of the viral life cycle requiring apoE as a host cell factor. It is conceivable that apoE could be involved in the early infection stages such as entry or replication as well as late stages of the viral life cycle, such as assembly or release of viral particles. To exclude an effect of apoE silencing on viral entry, we infected Huh7.5.1 cells with HCVpp and HCVcc. As shown in Fig. 5, apoE silencing had no effect on HCVpp entry or HCV infection. In contrast, silencing the HCV entry factor CD81 resulted in marked inhibition of HCVpp entry (Fig. 5A) and HCVcc infection (Fig. 5B). These data demonstrate that host cell apoE is not essential for viral entry.

To investigate a potential effect of apoE silencing on viral replication, Huh7.5.1 cells were co-electroporated with HCV Luc-Jc1 RNA and apoE siRNA. As shown in Fig. 5C, silencing of apoE expression did not significantly alter HCV replication. In contrast, an antiviral siRNA (siHCV331) targeting the 5′ nontranslated region of the viral genome²¹ markedly inhibited viral replication (Fig. 5C). These results demonstrate that silencing of apoE expression did not modulate HCV replication. This finding is further supported by the results of co-localization studies (Fig. 3) in which HCV NS5A protein was also detected in cells with low or absent apoE expression.

ApoE Is Involved in Assembly and Release of Infectious HCV Virions. Because apoE was required to pro-

duce infectious viral particles but did not interfere with viral replication, it is likely that apoE is involved in a postreplication stage of the viral life cycle. Postreplication virus–host interaction stages include viral assembly and release of viral particles from the infected hepatocytes. To address whether apoE was required for assembly and release, we partially purified intracellular infectious viral particles from cellular lysates or supernatants from Luc-Jc1 replicating cells. Infectivity of the particles present in cell culture lysates or supernatants was analyzed after incubation with naïve Huh7.5.1 cells. Two experimental conditions were used for apoE silencing: protocol A, in which siRNAs targeting apoE or control siRNA were transfected 72 hours before electroporation of cells with

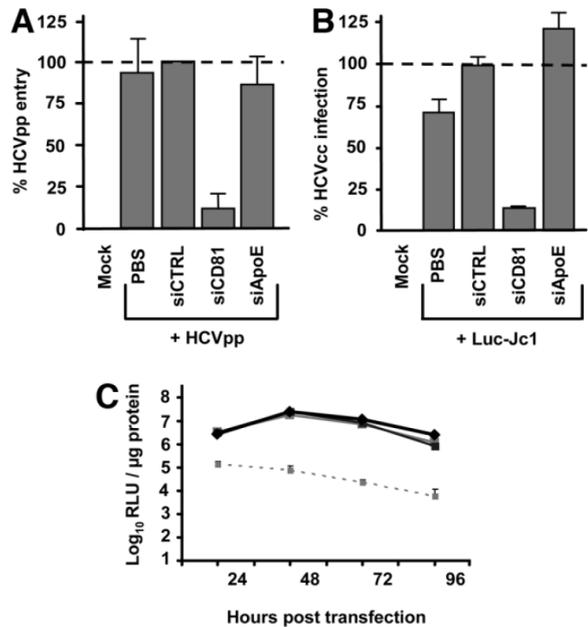
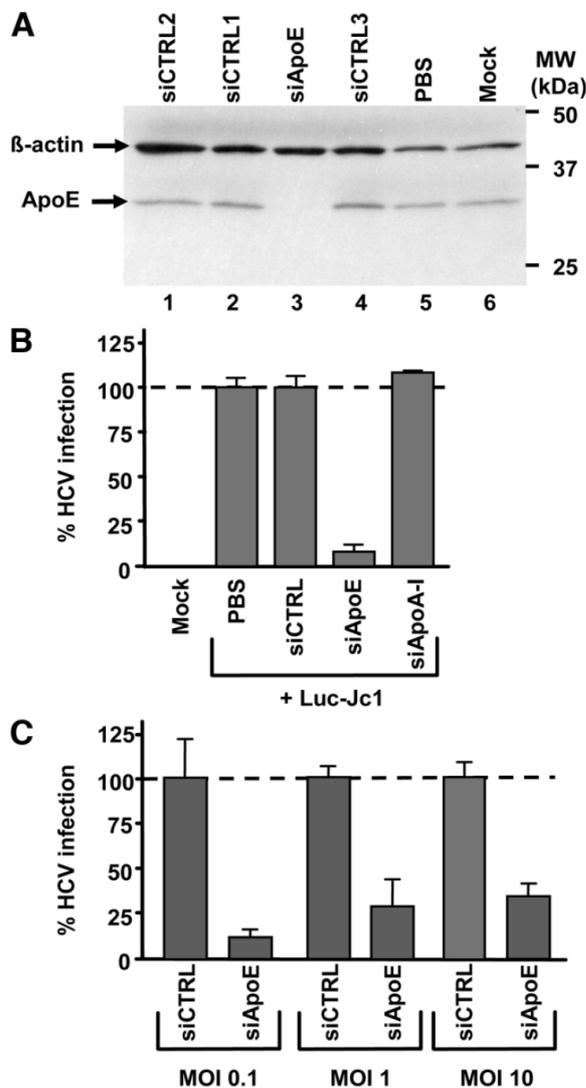


Fig. 5. Impact of apoE silencing on entry and replication of HCV Luc-Jc1. Huh7.5.1 cells were transfected with siRNA targeting apoE (siApoE) and CD81 (siCD81) expression or irrelevant control RNAs (siCTRL). Forty-eight hours later, Huh7.5.1 cells were infected with HCVpp (A) or HCVcc Luc-Jc1 (B). Seventy-two hours later, HCV entry was assessed by quantitation of luciferase activity (mean \pm SD; n = 4). (C) Huh7.5.1 were co-electroporated with HCV Luc-Jc1 and PBS (dark gray curve), control siRNA (light gray curve), siApoE (black curve), or siRNA targeting HCV translation (dashed curve). Twenty-two to 96 hours later, replication was assessed by quantitation of luciferase reporter activity. The results are expressed as a percentage of entry (A) or infection (B) or Relative light units (RLU) per microgram protein (C).

Fig. 4. Silencing of apoE expression in Huh7.5.1 cells results in inhibition of HCV particle production. (A) Silencing of apoE expression in Huh7.5.1 cells. Huh7.5.1 cells were transfected with siRNAs as described in Materials and Methods. Lysates of control naïve Huh7.5.1 (Mock), PBS, siApoE or control siRNA (siCTRL) transfected cells (siCTRL) were subjected to immunoblotting using rabbit anti-apoE and anti-beta-actin monoclonal antibodies and horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies. ApoE and beta-actin are indicated on the left, and molecular weight (MW) markers (kDa) are indicated on the right. (B) Inhibition of HCV particle production in Huh7.5.1 cells with silenced apoE expression. Huh7.5.1 cells were transfected with siRNAs and HCV Luc-Jc1 RNA. Cell culture supernatants of nontransfected cells (Mock), PBS, siCTRL, siApoE, siApoA1, and HCV Luc-Jc1 co-transfected Huh7.5.1 cells were concentrated 50-fold 72 hours after transfection of HCV Luc-Jc1 RNA. Concentrated supernatants (150 μ L) were then used to infect 6×10^4 naïve Huh7.5.1 cells. Infectivity of supernatants from mock, PBS, siCTRL, or siApoE treated cells was quantified by measuring of luciferase activity in Huh7.5.1 lysates 72 hours after infection (mean \pm SD; n = 4). (C) Impact of apoE silencing on HCV production in single-cycle infection experiments. Huh7.5.1 cells were transfected with control (CTRL) siRNA or apoE siRNA. Transfected cells were then infected with recombinant Luc-Jc1 HCV at different multiplicities of infection (MOI) using virus stocks with TCID50 of 10^3 /mL, 10^4 /mL, and 10^5 /mL, corresponding to MOIs of 0.1, 1, and 10, respectively. Seventy-two hours after infection, cell supernatants containing infectious virions were used to infect new naïve Huh7.5.1 cells. Infectivity of supernatants was assessed 48 hours later as described previously. The results are expressed as a percentage of infection of cells treated with CTRL siRNA. A representative experiment of two experiments performed in triplicate is shown.

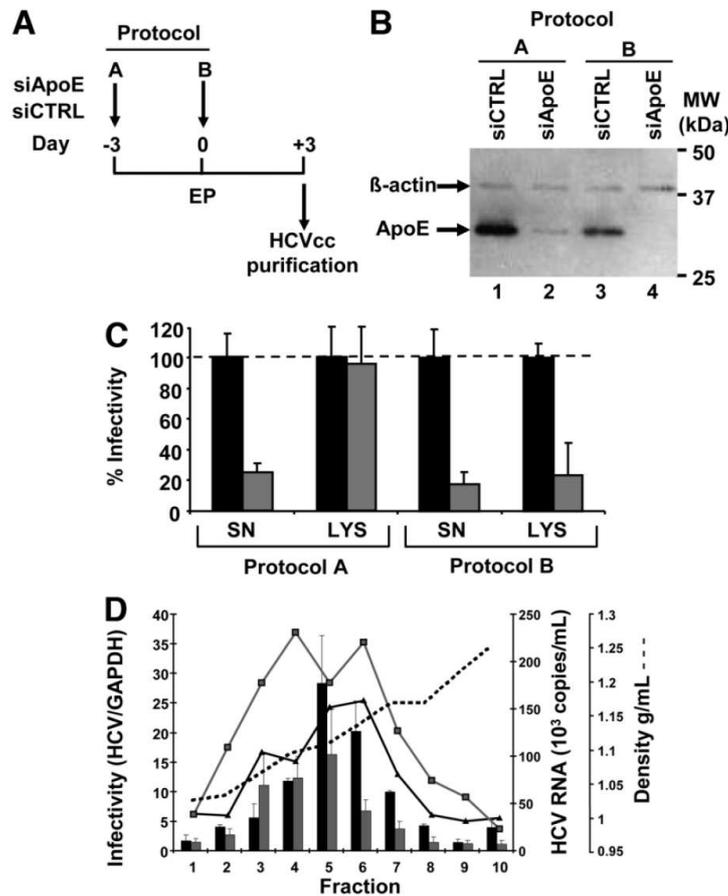


Fig. 6. Silencing of apoE expression results in an impairment of viral assembly and release. (A) Schematic outline of apoE silencing protocols. In protocol A, apoE siRNAs or CTRL siRNAs were transfected 72 hours before electroperoration (EP) of cells with HCV Luc-Jc1 RNA, whereas in protocol B apoE siRNAs or CTRL siRNAs were co-electroporated with HCV Luc-Jc1 RNA. (B) ApoE expression after RNAi silencing. Seventy-two hours after electroperoration of HCV RNA, apoE expression was analyzed by immunoblot as described in Fig. 4. (C) Effect of apoE silencing on the quantity of infectious virions purified from the intracellular and extracellular fractions of HCV replicating Huh7.5.1 cells. Supernatants (SN) or lysates (LYS) from cells treated with CTRL siRNAs (black bars) or apoE siRNAs (gray bars) as shown in A were subjected to sucrose cushion ultracentrifugation, and pelleted particles were used to infect naïve Huh7.5.1 cells. Infectivity was assessed as described in Fig. 4. The results are expressed as a percentage of infection of cells treated with CTRL siRNA (mean \pm SD; n = 6). (D) Biophysical characterization of released HCV virions in cells with silenced apoE expression. Cells were transfected with siCTRL or siApoE as described in protocol A. Concentrated (50 \times) cell culture supernatants were subjected to 10% to 50% iodixanol step gradients and subjected to equilibrium ultracentrifugation as described in Materials and Methods. Fractions obtained from gradients with siCTRL (in black) or siApoE (in gray) transfected cells were measured for RNA content by quantitative reverse transcription PCR quantification (lines) and tested for infectivity on naïve Huh7.5.1 cells (bars). Infectivity was measured 72 hours later by quantitative reverse transcription PCR quantification. RNA cell extraction was normalized with glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase quantification. Mean and standard deviation of three independent experiments are shown. The dotted line represents the density (in g/mL) of each fraction.

HCV RNA, and protocol B, in which siRNAs were co-electroporated with HCV RNA (Fig. 6A). ApoE silencing was analyzed by immunoblot 72 hours after HCV RNA electroperoration (Fig. 6B). Protocol A resulted in less efficient apoE silencing than protocol B at the time of HCVcc harvesting (Fig. 6B). In both protocols, apoE silencing resulted in a marked decrease in the infectivity of extracellular virions, confirming a functional role for apoE in virion production (Fig. 6C). When siRNAs and HCV RNA were co-transfected (protocol B, Fig. 6A),

silencing of apoE resulted in a marked decrease in the infectivity of virions purified from intracellular lysates as well as virions present in supernatants from transfected cells (Fig. 6C, right panel). A dual effect on both intracellular and released infectious particles suggests that apoE is a co-factor for viral assembly. When siRNAs were transfected before electroperoration of HCV RNA (protocol A, Fig. 6A), a similar decrease in the infectivity of cell culture supernatants was observed. In contrast, the infectivity of particles in cellular lysates was almost unchanged 72

hours after HCV RNA electroporation (Fig. 6C). The marked inhibition of released infectious particles (present in cell culture supernatants) without a concomitant decrease of intracellular particles (present in cellular lysates) suggests an additional effect of apoE silencing on release of viral particles. The minor effect of apoE silencing on assembly in this experiment may be attributable to the fact that low-level apoE silencing may still allow particle assembly. Furthermore, the impairment in release may have resulted in an accumulation of intracellular virions.

To further address the impact of apoE silencing on viral assembly and egress, we performed time course experiments after apoE silencing in HCV replicating cells. ApoE silencing resulted in an early effect on the release of infectious particles and a late effect on the assembly of intracellular infectious virions (Fig. 7). These findings suggest that apoE is a co-factor for two distinct steps in the assembly–egress process. The delayed effect of apoE silencing on assembly may be attributable to the impairment of viral release resulting in an accumulation of intracellular virions as well as the presence of a pool of pre-assembled particles that are not affected by apoE silencing during early time points.

As shown in Fig. 6D, apoE silencing did not markedly modify the biophysical properties of released infectious viral particles (Fig. 6D).

ApoE-NS5A Interaction Is Lost in Viral Mutants with a Defect in Viral Assembly. To further confirm the functional impact of apoE–NS5A interaction for viral assembly, we studied apoE–NS5A interaction using mutant NS5A from viral variants with a defect in virus production. Using site-directed mutagenesis, we introduced an alanine triplet substitution at positions 99 to 101 or 102 to 104 of the JFH1 NS5A protein as described by Miyanari et al.⁸ These mutations have been shown to result in a defect of virion production in an infectious cell culture model.^{1,8} As shown in Fig. 8A, NS5A mutants containing these mutations lost their ability to interact with apoE in a yeast two-hybrid system. A marked reduction in apoE–NS5A interaction (Fig. 8B) was also observed for NS5A of a viral variant containing a deletion of the NS5A domain III and a marked impairment of viral assembly.^{1,8} This functional correlation between apoE–NS5A binding (Fig. 8) and assembly/production phenotype^{1,8} further confirms the functional relevance of apoE–NS5A interaction in the production of infectious viral particles.

Discussion

Using an infectious HCV cell culture system, we demonstrate that apoE binds to HCV nonstructural protein NS5A. This conclusion is supported by a specific and

easily detectable apoE–NS5A interaction in co-immunoprecipitation and co-localization studies in human hepatoma cells containing replicating infectious HCV as well as a yeast two-hybrid assay (Figs. 1–3).

The HCV NS5A protein is anchored in the endoplasmic reticulum (ER) via its N-terminal part (31) and forms ‘claw-like’ dimers presumably facing away from the membrane where it could accommodate either single- or double-stranded RNA and interact with viral and cellular proteins and membranes (32, 33). Having identified an interaction between apoE and NS5A in HCV replicating cells, it is conceivable that the apoE–NS5A interaction takes place in the vicinity or within the replication complex and that this interaction recruits apoE to the viral assembly modules which results in the production of viral particles released from the infected hepatocytes. The hypothesis of apoE–NS5A interaction within the membranous web is supported by the vesicular membranous structures harbouring replicating virus being enriched with lipoproteins including apoE (5, 6). This hypothesis is also supported by recent studies demonstrating an important role of NS5A in HCV virion production: NS5A has been shown to be recruited by core-associated lipid droplets in replicating Huh7.5 cells to allow robust infectious particle production (8, 12). Using reverse genetics, the NS5A domain III has been identified as an important viral determinant for virion production (1, 8). The relevance of apoE–NS5A interaction for virus production is further supported by the loss of apoE–NS5A binding from viral variants (8, 13) with a defect in virus production in the yeast-two-hybrid system (Fig. 8). Thus, our results identify apoE–NS5A binding as a novel virus–host interaction and point to apoE–NS5A binding having a crucial function in the production of infectious particles. Further studies are underway to fine-map the structural determinants of NS5A–apoE interactions and its impact on the viral phenotype.

The functional characterization in an infectious cell culture system suggests that apoE is involved in assembly and release of viral infectious particles. This conclusion is supported by the finding that apoE silencing results in a marked decrease in viral particles in cell lysates and supernatants of Huh7.5.1 cells electroporated with HCV RNA (Protocol B; Fig. 6C). Interestingly, when apoE silencing was less pronounced at the time of HCVcc harvest (protocol A; Fig. 6B), apoE silencing still resulted in a decrease in released infectious particles with concomitant retention of infectious viral particles in the host cell (Fig. 6C). It seems likely, therefore, that efficient silencing of apoE at the time of HCVcc harvest results in impairment of viral assembly and release, whereas low-level silencing may allow assembly of viral particles but results in impair-

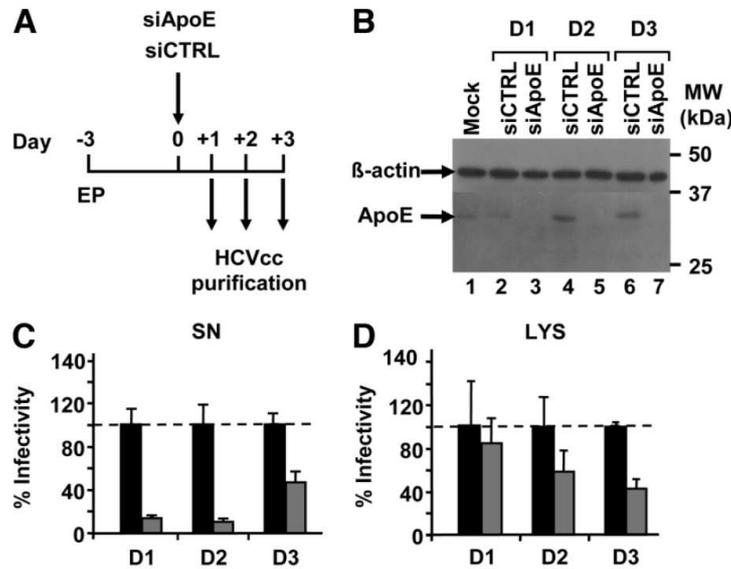


Fig. 7. Time-course of apoE silencing and impact on production of infectious virions. (A) Schematic outline of the time course of the experimental protocol. Cells were electroporated with HCV Luc-Jc1 RNA 3 days (day -3) before transfection with apoE and control (CTRL) siRNAs (day 0). On day 0, supernatants were removed and replaced by fresh tissue culture medium to deplete HCVcc in the extracellular medium at the time of siRNA transfection. On days 1, 2, and 3 after siRNA transfection, supernatants or lysates from cells treated with CTRL siRNAs or apoE siRNAs were subjected to sucrose cushion ultracentrifugation, and pelleted particles were used to infect naïve Huh7.5.1 cells. Infectivity was assessed as described in Fig. 4. (B) Analysis of silenced apoE expression in cell lysates using immunoblotting as described in Fig. 4A. (C, D) Infectivity of supernatants (SN, shown in panel C) or lysates (LYS, shown in panel D) from cells treated with CTRL siRNAs (black bars) or apoE siRNAs (gray bars). The results are expressed as a percentage of infection of cells treated with CTRL siRNA (mean \pm SD; n = 6).

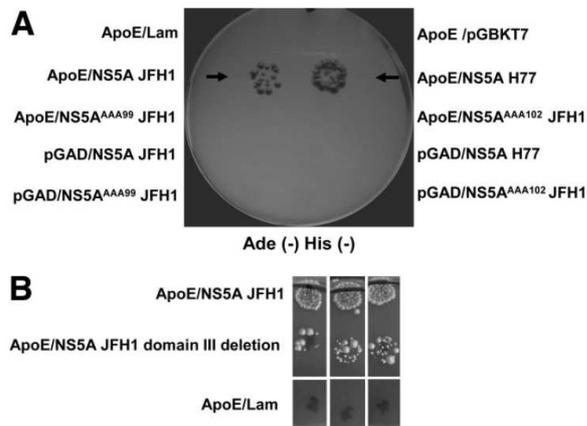


Fig. 8. ApoE-NS5A interaction is absent or decreased in viral mutants with a defect in viral assembly. AH109 yeasts (matchmaker Clontech) were co-transformed with a plasmid encoding fusion of apoE protein and the activation domain of Gal4 and plasmids encoding fusions of the DNA binding domain of Gal4 and wild-type JFH1 NS5A or mutant JFH1 NS5A containing (A) an alanine triplet substitution at position 99 (NS5A^{AAA99} JFH1) or 102 (NS5A^{AAA102} JFH1)⁸ or (B) a deletion in domain III of NS5A resulting in abolishment of particle production (“domain III deletion”).¹³ Lam, pGBKT7, pGAD expressing a fusion between Gal 4 DNA binding domain and control protein laminin, DNA binding domain of Gal4, and activation domain of Gal4, respectively, were used as controls.

ment of viral release. Time course experiments (Fig. 7) showed an early effect of apoE silencing on released infectious particles and a late effect on the assembly of intracellular infectious virions. These data further support a model for apoE as a co-factor for two distinct steps of the assembly-egress process of the viral life cycle.

Recent studies have provided evidence that the very low density lipoprotein (VLDL) pathway appears to play a role in HCV assembly, maturation and egress. Indeed, the membrane vesicles in which HCV replicates are highly enriched in proteins required for VLDL assembly, including apoB, apoE, and microsomal triglyceride transfer protein (5, 6). Moreover, Gastaminza et al. (6) demonstrated that HCV assembly and maturation occur in the endoplasmic reticulum and post-endoplasmic reticulum compartments, respectively, in a manner that parallels the formation of VLDL. In addition, it was demonstrated that only low-density particles are efficiently secreted and that immature particles are actively degraded.⁶ Gastaminza and colleagues⁶ postulated that by coopting the VLDL assembly, maturation, degradation, and secretory machinery of the cell, HCV acquires its hepatocyte tropism. Efficient HCV spread has been shown to be impaired in cells expressing reduced apoB

levels.⁶ Furthermore, reduced apoB secretion by short hairpin RNA has been shown to reduce viral particle assembly and secretion without interfering with infection efficiency or HCV RNA replication.⁶ Complementing these studies, Chang et al.¹¹ demonstrated that HCV infectious virions purified from low-density fractions from cell culture supernatants are assembled as apoE-enriched lipoprotein particles and could be precipitated specifically by anti-apoE and anti-E2 antibodies. Collectively, our results identify NS5A as a viral factor providing a link between virus production and the VLDL pathway.

Several studies in HCV-infected patients have shown a statistically significant association between the presence of allelic isoforms of apoE and the severity of HCV-induced liver disease.^{34,35} The apoE-epsilon4 allele was associated with a poor sustained viral response to interferon-alpha-based treatment.³⁶ Taken together, these observations underline the impact of apoE as a host factor playing an important role in HCV-host interactions and the pathogenesis of disease.

Because our results demonstrate that silencing of intracellular apoE results in impaired particle assembly and release, it is conceivable that the interaction of HCV with components of the VLDL export pathway is a novel target for antiviral therapies. This concept is supported by a recent study demonstrating that stimulation of infected hepatocytes with the flavonoid naringenin significantly inhibits HCV secretion.³⁷ Thus, drug-induced decrease of apoE in the liver of the HCV-infected patient may represent a novel approach for control of viral infection.

Acknowledgment: The authors thank C. Thumann for support in HCVcc purification (Inserm U748), R. Bartenschlager (University of Heidelberg), T. Wakita (National Institutes of Health, Tokyo), C. M. Rice (Rockefeller University, New York), F. V. Chisari (The Scripps Research Institute, La Jolla), and F.-L. Cosset (Inserm U758, ENS, Lyon) for providing HCV strains and human hepatoma cell lines, and K. Shimotohno, J. Dubuisson, and R. Bartenschlager for helpful discussions.

References

- Alter H. Viral hepatitis. *HEPATOLOGY* 2006;43(2 Suppl 1):S230-S234.
- Tai AW, Chung RT. Treatment failure in hepatitis C: mechanisms of non-response. *J Hepatol* 2009;50:412-420.
- Barth H, Liang TJ, Baumert TF. Hepatitis C virus entry: molecular biology and clinical implications. *HEPATOLOGY* 2006;44:527-535.
- Moradpour D, Penin F, Rice CM. Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Microbiol* 2007;5:453-463.
- Huang H, Sun F, Owen DM, Li W, Chen Y, Gale M, Jr., et al. Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:5848-5853.
- Gastaminza P, Cheng G, Wieland S, Zhong J, Liao W, Chisari FV. Cellular determinants of hepatitis C virus assembly, maturation, degradation, and secretion. *J Virol* 2008;82:2120-2129.
- 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;88:2204-2213.
- Miyanari Y, Atsuzawa K, Usuda N, Watashi K, Hishiki T, Zayas M, et al. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol* 2007;9:1089-1097.
- 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;9:1268-1282.
- Piodi A, Chouteau P, Lerat H, Hezode C, Pawlotsky JM. Morphological changes in intracellular lipid droplets induced by different hepatitis C virus genotype core sequences and relationship with steatosis. *HEPATOLOGY* 2008;48:16-27.
- Chang KS, Jiang J, Cai Z, Luo G. Human apolipoprotein e is required for infectivity and production of hepatitis C virus in cell culture. *J Virol* 2007;81:13783-13793.
- Shavinskaya A, Boulant S, Penin F, McLauchlan J, Bartenschlager R. The lipid droplet binding domain of hepatitis C virus core protein is a major determinant for efficient virus assembly. *J Biol Chem* 2007;282:37158-37169.
- Appel N, Zayas M, Miller S, Krijnse-Locker J, Schaller T, Friebe P, et al. Essential role of domain III of nonstructural protein 5A for hepatitis C virus infectious particle assembly. *PLoS Pathog* 2008;4:e1000035.
- Dimitrova M, Imbert I, Kieny MP, Schuster C. Protein-protein interactions between hepatitis C virus nonstructural proteins. *J Virol* 2003;77:5401-5414.
- Dimitrova M, Affolter C, Meyer F, Nguyen I, Richard DG, Schuster C, et al. Sustained delivery of siRNAs targeting viral infection by cell-degradable multilayered polyelectrolyte films. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:16320-16325.
- Koutsoudakis G, Kaul A, Steinmann E, Kallis S, Lohmann V, Pietschmann T, et al. Characterization of the early steps of hepatitis C virus infection by using luciferase reporter viruses. *J Virol* 2006;80:5308-5320.
- Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, Wolk B, Tellinghuisen TL, Liu CC, et al. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 2005;309:623-626.
- Pietschmann T, Kaul A, Koutsoudakis G, Shavinskaya A, Kallis S, Steinmann E, et al. Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:7408-7413.
- Zeisel MB, Koutsoudakis G, Schnober EK, Haberstroh A, Blum HE, Cosset FL, et al. Scavenger receptor class B type I is a key host factor for hepatitis C virus infection required for an entry step closely linked to CD81. *HEPATOLOGY* 2007;46:1722-1731.
- Kolykhalov AA, Agapov EV, Blight KJ, Mihalik K, Feinstone SM, Rice CM. Transmission of hepatitis C by intrahepatic inoculation with transcribed RNA. *Science* 1997;277:570-574.
- Wolf M, Dimitrova M, Baumert TF, Schuster C. The major form of hepatitis C virus alternate reading frame protein is suppressed by core protein expression. *Nucleic Acids Res* 2008;36:3054-3064.
- Burckstummer T, Kriegs M, Lupberger J, Pauli EK, Schmittl S, Hildt E. Raf-1 kinase associates with hepatitis C virus NS5A and regulates viral replication. *FEBS Lett* 2006;580:575-580.
- Bartosch B, Dubuisson J, Cosset FL. Infectious hepatitis C virus pseudoparticles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J Exp Med* 2003;197:633-642.
- Pestka JM, Zeisel MB, Blaser E, Schurmann P, Bartosch B, Cosset FL, et al. Rapid induction of virus-neutralizing antibodies and viral clearance in a single-source outbreak of hepatitis C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:6025-6030.
- Gastaminza P, Kapadia SB, Chisari FV. Differential biophysical properties of infectious intracellular and secreted hepatitis C virus particles. *J Virol* 2006;80:11074-11081.

26. Lohmann V, Korner F, Koch J, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 1999;285:110-113.
27. Brandenburg B, Stockl L, Gutzeit C, Roos M, Lupberger J, Schwartlander R, et al. A novel system for efficient gene transfer into primary human hepatocytes via cell-permeable hepatitis B virus-like particle. *HEPATOLOGY* 2005;42:1300-1309.
28. Hildt E, Oess S. Identification of Grb2 as a novel binding partner of tumor necrosis factor (TNF) receptor I. *J Exp Med* 1999;189:1707-1714.
29. Roohvand F, Maillard P, Lavergne JP, Boulant S, Walic M, Andreo U, et al. Initiation of hepatitis C virus infection requires the dynamic microtubule network: role of the viral nucleocapsid protein. *J Biol Chem* 2009;284:13778-13791.
30. Shi ST, Polyak SJ, Tu H, Taylor DR, Gretch DR, Lai MM. Hepatitis C virus NS5A colocalizes with the core protein on lipid droplets and interacts with apolipoproteins. *Virology* 2002;292:198-210.
31. Penin F, Brass V, Appel N, Ramboarina S, Montserret R, Ficheux D, et al. Structure and function of the membrane anchor domain of hepatitis C virus nonstructural protein 5A. *J Biol Chem* 2004;279:40835-40843.
32. Huang L, Hwang J, Sharma SD, Hargittai MR, Chen Y, Arnold JJ, et al. Hepatitis C virus nonstructural protein 5A (NS5A) is an RNA-binding protein. *J Biol Chem* 2005;280:36417-36428.
33. Tellinghuisen TL, Marcotrigiano J, Rice CM. Structure of the zinc-binding domain of an essential component of the hepatitis C virus replicase. *Nature* 2005;435:374-379.
34. Price DA, Bassendine MF, Norris SM, Golding C, Toms GL, Schmid ML, et al. Apolipoprotein epsilon3 allele is associated with persistent hepatitis C virus infection. *Gut* 2006;55:715-718.
35. Wozniak MA, Itzhaki RF, Faragher EB, James MW, Ryder SD, Irving WL. Apolipoprotein E-epsilon 4 protects against severe liver disease caused by hepatitis C virus. *HEPATOLOGY* 2002;36:456-463.
36. Mueller T, Gessner R, Sarrazin C, Graf C, Halangk J, Witt H, et al. Apolipoprotein E4 allele is associated with poor treatment response in hepatitis C virus (HCV) genotype 1. *HEPATOLOGY* 2003;38:1592-1593.
37. Nahmias Y, Goldwasser J, Casali M, van PD, Wakita T, Chung RT, et al. Apolipoprotein B-dependent hepatitis C virus secretion is inhibited by the grapefruit flavonoid naringenin. *HEPATOLOGY* 2008;47:1437-1445.

Article 2 : L'inhibition de l'infection du VHC par des anticorps anti-CLDN1 est médiée par la neutralisation de l'association E2-CD81-CLDN1

En 2007, Evans et al., identifiait un nouveau co-facteur d'entrée pour le VHC : la protéine de jonction CLDN1 (Evans *et al.*, 2007). Afin de mieux comprendre le rôle de CLDN1 dans le mécanisme d'entrée du VHC dans sa cellule hôte, nous avons produit, par immunisation génétique de rats, des anticorps polyclonaux anti-CLDN1. Nous avons caractérisé ces anticorps pour leur spécificité de reconnaissance et nous avons montré que ces anticorps reconnaissent spécifiquement les domaines extracellulaires de la protéine CLDN1.

En utilisant le système des VHCcc, nous avons sélectionné les anticorps anti-CLDN1 capables d'inhiber l'infection de cellules hépatocytaires par le VHC. Dans un premier temps, nous avons testé l'effet de ces anticorps en combinaison avec des anticorps ciblant les co-facteurs d'entrée CD81 et SR-B1. Ce dernier facteur a déjà fait l'objet d'une étude extensive dans notre laboratoire (Zeisel *et al.*, 2007). Nous avons montré que les anticorps anti-CLDN1 obtenus inhibent l'infection par le VHC de manière additive lorsqu'ils étaient administrés en même temps que l'un ou l'autre ou que les deux anticorps inhibiteurs d'entrée anti-CD81 et anti-SR-BI. Nous avons ensuite voulu définir la séquence des événements conduisant à l'entrée du virus dans sa cellule cible. Pour cela, nous avons réalisé une cinétique d'entrée du VHC dans la cellule hépatocytaire. Nous avons ainsi pu montrer que les anticorps anti-CLDN1 agissaient au même moment que les co-facteurs CD81 et SRB1 lors de la cinétique d'entrée.

A l'heure actuelle, aucune interaction entre la glycoprotéine d'enveloppe E2 et la protéine CLDN1 n'a pu être démontrée. Cependant, nous avons montré que l'attachement de la glycoprotéine E2 soluble, mais également des VHCcc pouvait être inhibé par les anticorps anti-CLDN1. Notre but était de comprendre comment les anticorps anti-CLDN1 pouvaient agir pour bloquer l'entrée du virus. Pour cela, nous avons analysé, en collaboration avec le laboratoire de J. McKeating (University of Birmingham, UK), l'effet des anticorps anti-CLDN1 sur l'interaction entre des homodimères CLDN1-CLDN1 ou CD81-CD81 ou des hétérodimères CLDN1-CD81. Pour cela, nous avons utilisé la technique du FRET décrit par Harris et al. (Harris *et al.*, 2008). Nous avons ainsi mis en évidence que l'association entre les co-facteurs CDLN1 et CD81 était perturbée en présence des anticorps anti-CDLN1.

Finalement, nous proposons que l'entrée du VHC requière la formation d'un complexe entre le virus, via la glycoprotéine d'enveloppe E2, et les co-facteurs d'entrée, CD81 et CLDN1, associés en hétérodimères à la surface de cellules hépatocytaires.

Inhibition of Hepatitis C Virus Infection by Anti-Claudin-1 Antibodies Is Mediated by Neutralization of E2-CD81-Claudin-1 Associations

Sophie E. Krieger,^{1,2} Mirjam B. Zeisel,^{1,2} Christopher Davis,³ Christine Thumann,^{1,2} Helen J. Harris,³ Eva K. Schnober,⁴ Christopher Mee,³ Eric Soulier,^{1,2} Cathy Royer,^{1,2} Mélanie Lambotin,^{1,2} Fritz Grunert,⁵ Viet Loan Dao Thi,⁶ Marlène Dreux,⁶ François-Loïc Cosset,⁶ Jane A. McKeating,³ Catherine Schuster,^{1,2} and Thomas F. Baumert^{1,2,7}

The tight junction protein claudin-1 (CLDN1) has been shown to be essential for hepatitis C virus (HCV) entry—the first step of viral infection. Due to the lack of neutralizing anti-CLDN1 antibodies, the role of CLDN1 in the viral entry process is poorly understood. In this study, we produced antibodies directed against the human CLDN1 extracellular loops by genetic immunization and used these antibodies to investigate the mechanistic role of CLDN1 for HCV entry in an infectious HCV cell culture system and human hepatocytes. Antibodies specific for cell surface-expressed CLDN1 specifically inhibit HCV infection in a dose-dependent manner. Antibodies specific for CLDN1, scavenger receptor B1, and CD81 show an additive neutralizing capacity compared with either agent used alone. Kinetic studies with anti-CLDN1 and anti-CD81 antibodies demonstrate that HCV interactions with both entry factors occur at a similar time in the internalization process. Anti-CLDN1 antibodies inhibit the binding of envelope glycoprotein E2 to HCV permissive cell lines in the absence of detectable CLDN1-E2 interaction. Using fluorescent-labeled entry factors and fluorescence resonance energy transfer methodology, we demonstrate that anti-CLDN1 antibodies inhibit CD81-CLDN1 association. In contrast, CLDN1-CLDN1 and CD81-CD81 associations were not modulated. Taken together, our results demonstrate that antibodies targeting CLDN1 neutralize HCV infectivity by reducing E2 association with the cell surface and disrupting CD81-CLDN1 interactions. **Conclusion:** These results further define the function of CLDN1 in the HCV entry process and highlight new antiviral strategies targeting E2-CD81-CLDN1 interactions. (HEPATOLOGY 2010;51:000-000.)

With an estimated 170 million infected individuals, hepatitis C virus (HCV) has a major impact on public health. HCV is a hepatotropic virus that causes persistent infection in the majority of infected individuals.¹ Therapeutic options for chronic infection are limited, and a vaccine is not available.² HCV entry into hepatocytes is the first step of the viral life cycle resulting in productive viral infection.^{3,4} Furthermore,

Abbreviations: BC, bile canalicular surface; CLDN1, claudin-1; CMFDA, 5-chloromethylfluorescein diacetate; EL1 and 2, extracellular loops 1 and 2; FRET, fluorescence resonance energy transfer; HCV, hepatitis C virus; HCVcc, cell culture-derived HCV; HCVpp, HCV pseudoparticles; IgG, immunoglobulin G; PBS, phosphate-buffered saline; SD, standard deviation; SR-BI, scavenger receptor class B type I; TJ, tight junction.

From ¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U748, Strasbourg, France; ²Université de Strasbourg, Strasbourg, France; the ³Hepatitis C Research Group, Division of Immunity and Infection, University of Birmingham, Birmingham, United Kingdom; the ⁴Department of Medicine II, University of Freiburg, Freiburg, Germany; ⁵Genovac, Freiburg, Germany; ⁶Université de Lyon, UCB-Lyon 1, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U758, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Lyon, France; and ⁷Service d'Hépatogastroentérologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France.

Received August 6, 2009; accepted November 10, 2009.

Supported by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, France; the European Union (ERC-2008-AdG-233130-HEPCENT and INTERREG-IV-Rhin Supérieur-FEDER-Hepato-Regio-Net 2009); the chair of excellence program of the Agence Nationale de la Recherche (ANR-05-CEXC-008), France; the Agence Nationale de la Recherche sur le SIDA et les Hépatites Virales (ANRS-06221 and 2008/354), France; the FRM-BNP Paribas Foundation, Paris; the German Research Foundation (DFG Ba1417-11-2); the Deutsche Leberstiftung, Hanover, Germany; the Else-Kröner-Fresenius Stiftung, Bad Homburg (P17/07//A83/06), Germany; the Medical Research Council, United Kingdom; and The Wellcome Trust, United Kingdom. S.K. was supported by a fellowship of the French Ministry for Research and Education through ANR-05-CEXC-008.

Address reprint requests to: Prof. Thomas F. Baumert, M.D., INSERM Unit 748, Université de Strasbourg, 3 Rue Koeberlé, F-67000 Strasbourg, France. E-mail: thomas.baumert@unistra.fr; fax: (33)-3-68-85-37-24.

Copyright © 2009 by the American Association for the Study of Liver Diseases.

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

DOI 10.1002/hep.23445

Potential conflict of interest: Nothing to report.

1

HCV entry is a major target of host neutralizing responses⁵⁻⁷ and a target for antiviral immunopreventive and therapeutic strategies (for review, see Timpe and McKeating⁴ and Zeisel⁸). Viral entry is believed to be mediated by the viral envelope glycoproteins E1 and E2 and several host entry factors. These include heparan sulfate, tetraspanin CD81, scavenger receptor class B type I (SR-BI),³ and the tight junction (TJ) proteins claudin-1 (CLDN1)⁹ and occludin.^{10,11} Because none of these host cell surface factors alone is able to promote HCV entry, the interaction of HCV and its target cells leading to the internalization of the virus is believed to be a multistep process involving the interplay of several host cell factors.^{3,4,8}

Evans and colleagues⁹ reported that CLDN1 is essential for HCV infection. Subsequent studies demonstrated that CLDN-6 and -9 are also able to mediate HCV entry in nonpermissive cell lines.^{12,13} CLDNs are critical components of TJs that regulate paracellular permeability and polarity and have a tetraspanin topology with four transmembrane domains, two extracellular and one intracellular loops, and N- and C-terminal cytoplasmic domains.¹⁴ CLDN1 extracellular loop 1 (EL1) is required for HCV entry⁹ and is involved in barrier function and contributes to pore formation between polarized cells.¹⁵ Mutagenesis studies in nonpolarized 293T cells demonstrate that CLDN1 enrichment at cell-cell contacts may be important for HCV entry.¹⁶ We^{17,18} and others^{16,19,20} using a variety of imaging and biochemical techniques reported that CLDN1 associates with CD81. However, due to the lack of neutralizing anti-CLDN1 antibodies targeting extracellular epitopes, the exact role of CLDN1 in the viral entry process is poorly understood.

Materials and Methods

Cells. Human Huh7,⁵ Huh7.5.1,²¹ HepG2,¹⁸ 293T,⁵ Bosc,²² Caco-2,²³ and rat BRL-3A cell lines²⁴ were propagated in Dulbecco's modified Eagle's medium/10% fetal bovine serum. 293T/CLDN1 cells were obtained by stable transfection of 293T cells with a pcDNA3.1 vector encoding CLDN1. Dimethyl sulfoxide-mediated differentiation of Huh7.5.1 cells was performed as described.²⁵ Primary human hepatocytes were isolated from liver resections from patients at the Strasbourg University Hospitals with approval from the Institutional Review Board.^{26,27} In brief, liver specimens were perfused with calcium-free 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethanesulfonic acid buffer containing 0.5 mM ethylene glycol tetraacetic acid (Fluka) followed by perfusion with 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethanesulfonic acid containing 0.05% collagenase (Sigma) and 0.075% CaCl₂ at 37°C. Following washing of cells with phosphate-buffered saline (PBS) and

removal of nonviable cells by Percoll (Sigma) gradient centrifugation, freshly isolated hepatocytes (3×10^5 cells/well) were plated in 24-well plates precoated with collagen (Biocoat, BD Biosciences) and allowed to adhere in William's E medium (Sigma-Aldrich) containing 1% Glutamax (Gibco), 1% insulin transferrin selenium (Gibco), 10^{-7} M dexamethasone (Sigma), 0.15% bovine serum albumine (Sigma), and 10% fetal bovine serum (PAN Biotec).

Antibodies. Anti-CLDN1 antibodies were raised by genetic immunization of Wistar rats using a human CLDN1 complementary DNA expression vector. For screening, Bosc cells transfected with pCMV-SPORT6 or pCMV-SPORT6/CLDN1 were incubated with anti-CLDN1 or preimmune serum and analyzed for cell surface CLDN1 expression by flow cytometry as described.²⁸ Purified immunoglobulin G (IgG) from rat anti-CLDN1 serum were obtained by MAbTrap kit (GE Healthcare). To analyze cross-reactivity of antibodies with other members of the CLDN family, 293T cells were transfected to express AcGFP tagged CLDN1, 4, 6, 7, 9, 11, 15, and 17 or chimeric CLDN1/7 (described by Evans et al.⁹) and 48 hours later stained with rat anti-CLDN1 antibodies and Alexa-633 coupled anti-rat immunoglobulin (Invitrogen). Polyclonal rat anti-SR-BI or CD81 antibodies were obtained by genetic immunization as described.²⁶ R-phycoerythrin-conjugated and Cy5-conjugated anti-rat IgG were obtained from Jackson ImmunoResearch Laboratories, mouse IgG was obtained from Caltag, and mouse anti-CD81 (JS-81) was obtained from BD Biosciences.

Imaging Studies of Cell Surface CLDN1. Living Huh7.5.1 cells were incubated with preimmune or anti-CLDN1 serum (1/50) and a Cy5-conjugated anti-rat secondary antibody (1/300). Polarized Caco-2 cells, as described by Mee et al.,²³ were fixed in 3% paraformaldehyde, permeabilized with saponin, and stained with polyclonal anti-CLDN1 (1/50) or control serum. Following staining, cells were fixed, mounted, and observed using a Leica TCS SP2 CLSM (for Huh7.5.1) or a Zeiss Cell Axio Observer Z1 microscope (for Caco-2).

Determination of TJ Barrier Function. To determine the functionality of TJs and whether they restrict the paracellular diffusion of solutes from the bile-canalicular (BC) lumen to the basolateral medium (barrier function), HepG2 cells were treated with either control (PBS), rat anti-CLDN1, rat control serum, or interferon- γ and incubated with 5 mM 5-chloromethylfluorescein diacetate (CMFDA) (Invitrogen) at 37°C for 10 minutes to allow internalization and translocation to BC lumen by MRP2. After washing with PBS, the capacity of BC lumens to retain CMFDA was analyzed as described.¹⁸

Cell Culture-Derived HCV Production and Infection. Cell culture-derived HCV (HCVcc) (Luc-Jc1 or

Jc1) were generated as described.^{6,26,29} For infection experiments, Huh7.5.1 cells were preincubated in the presence or absence of antibodies for 1 hour at 37°C and infected at 37°C for 4 hours with HCVcc. Forty-eight hours later HCV infection was analyzed in cell lysates by quantification of luciferase activity or viral RNA.^{6,26,29,30} Kinetic studies in the presence of antibodies or inhibitors were performed as described.^{6,26,29,30}

HCV Pseudoparticle Production and Infection. Infection of 293T/CLDN1 or Huh7.5.1 cells with murine leukemia virus–based HCV pseudoparticles (HCVpp) in kinetic assays was performed as described.^{5,6} Primary hepatocytes were infected with HIV-based HCVpp expressing envelope glycoproteins of strains HCV-J (genotype 1b), JFH-1 (genotype 2a), UKN3A.1.28 (genotype 3a), and UKN4.21.16 (genotype 4). One day following hepatocyte isolation and plating, hepatocytes were washed with PBS and preincubated with rat anti-CLDN1 or control serum (1/50) for 1 hour at 37°C in William's E medium. Then, HCVpp were added for 3 hours at 37°C. Following infection, the supernatant was removed and replaced by fresh William's E medium. HCVpp infection was assessed by measurement of luciferase activity 72 hours postinfection.^{6,26}

Cellular Binding of HCV Envelope Glycoproteins. Production and binding of envelope glycoproteins has been described.^{6,24} For the study of E2 entry factor interaction, CHO cells were transfected with pcDNA3.1-based expression vectors encoding SR-BI, CD81 or CLDN1 as described.³¹ Expression of entry factors was assessed by flow cytometry using anti-receptor antibodies.³¹ For the study of envelope glycoprotein binding in the presence of anti-receptor antibodies, Huh7.5.1 cells²¹ or rat BRL-3A cells stably expressing human SR-BI, CD81, and CLDN1²⁴ were preincubated 1 hour at room temperature with rat anti-SR-BI, -CLDN1, -CD81 serum (1/100) or mouse anti-human CD81 (JS-81; 5 µg/mL) or control antibodies (1/100 or 5 µg/mL). Recombinant E2 (30 µL cell culture supernatant) or E1 (10 µg/mL) was added to cells for 1 hour at room temperature. Following washing with PBS, bound envelope glycoproteins were detected using flow cytometry and human anti-E1 (IGH526⁶) or mouse anti-His (RGS-His, Qiagen) and phycoerythrin-conjugated secondary antibodies.^{24,28} For quantitation of HCVcc binding, Huh7.5.1 cells were preincubated with heparin (250 µg/mL), anti-CLDN1 (1/50), or control serum (1/50) for 1 hour at 37°C prior to incubation with Jc1 HCVcc. Non-bound virus was removed by washing of cells with PBS. Binding of HCVcc was then quantified by reverse-transcription polymerase chain reaction of cell-bound HCV RNA as described.⁹

Receptor Association Using Fluorescence Resonance Energy Transfer. Homotypic and heterotypic interactions of CD81 and CLDN1 were analyzed in 293T cells transduced to express AcGFP and DsRED tagged CD81 and CLDN1 as described.^{17,18} The data from 10 cells were normalized and the localized expression calculated.

Statistical Analysis. Results are expressed as means ± standard deviation (SD). Statistical analyses were performed using the Student *t* test, and *P* < 0.05 was considered statistically significant.

Results

Production of Antibodies Directed Against Cell Surface CLDN1. To investigate the role of CLDN1 in HCV infection, we produced polyclonal anti-CLDN1 antibodies by genetic immunization and screened for reactivity with cell surface–expressed CLDN1. Antibodies were selected for their ability to bind nonpermeabilized Bosc cells transfected to express human CLDN1. Bosc cells are 293T-derived ecotropic packaging cells²² that do not express endogenous CLDN1 (data not shown). As shown in Fig. 1A, incubation of Bosc cells expressing human CLDN1 with polyclonal anti-CLDN1 sera resulted in a specific interaction with CLDN1 extracellular domains (Fig. 1A). To confirm the specific interaction of anti-sera with CLDN1, we generated 293T cells stably expressing human CLDN1 (Fig. 1B). Incubation of 293T/CLDN1 cells with rat polyclonal anti-CLDN1 antibodies resulted in a specific interaction of these antibodies with human CLDN1 (Fig. 1B). These data demonstrate that anti-CLDN1 antibodies obtained by genetic immunization specifically bind to the extracellular loops of human CLDN1 expressed on the cell surface. Using 293T cells transfected with AcGFP tagged CLDN1, 4, 6, 7, 9, 11, 15, and 17 or chimeric CLDN1/7, we show that anti-CLDN1 antibodies demonstrate minimal or absent cross-reactivity against other members of the CLDN family (Table 1).

Analysis of anti-CLDN1 reactivity to chimeric CLDN1/7 expressed on the cell surface of 293T cells demonstrated that the antibodies interact strongly with CLDN7, where the N-terminal third (N1/3) or half (N1/2) was replaced with the corresponding coding region of CLDN1 (Table 1). In contrast, the antibodies did not exhibit any detectable interaction with CLDN7, where the C-terminal half (C1/2) of EL1 was replaced with the corresponding coding region of CLDN1. A reduced interaction was observed for CLDN7 expressing the entire EL2 of CLDN1 (Table 1). These data demonstrate that anti-CLDN1 antibodies recognize epitopes in the N-terminal half of the CLDN1 EL1 which has been

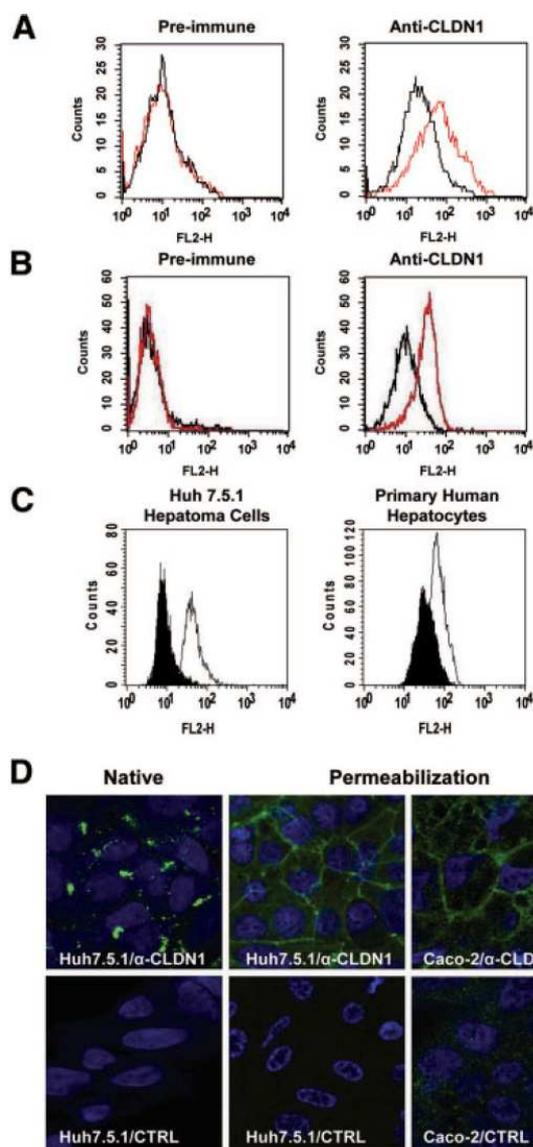
shown to be required for HCV entry⁹ as well as EL2 epitopes (Table 1). Because antibodies failed to recognize overlapping peptides encoding for linear epitopes comprising the CLDN1 EL1 and 2 in an enzyme-linked immunosorbent assay or an infection assay using peptides as capture antigens (data not shown), it is likely that epitopes targeted by anti-CLDN1 antibodies are conformation-dependent.

To study whether anti-CLDN1 antibodies bind to CLDN1 on the cell surface of HCV permissive cells, Huh7.5.1 and primary human hepatocytes were incubated with anti-CLDN1 antibodies and analyzed by flow cytometry. Positive staining of human Huh7.5.1 hepa-

Table 1. Anti-CLDN1 Antibody Reactivity with Members of the Human CLDN Family

AcGFP-CLDN Expression Construct	Frequency of AcGFP-CLDN-Positive Cells (%)	Frequency of Anti-CLDN1-Positive Cells (%)
Mock	0	0
CLDN1	51.3	47.5
CLDN4	53.7	1.14
CLDN6	18.4	0.27
CLDN7	46.6	0.91
CLDN9	21.8	0.41
CLDN11	38.2	0.52
CLDN15	27.5	0.42
CLDN17	24.4	3.4
CLDN7/1 N1/3	26.1	16.7
CLDN7/1 N1/2	12.6	7.33
CLDN7/1 C1/2	14.5	0.29
CLDN7/1 EL2	27.6	7.1

293T cells were transfected with plasmids encoding a panel of AcGFP-tagged human CLDNs (1, 4, 6, 7, 9, 11, 15, 17) and CLDN7/1 chimeric proteins, where the N-terminal third (N1/3), half (N1/2), or C-terminal half (C1/2) of EL1 or the entire EL2 is replaced with the corresponding coding region of CLDN1 as described.⁹ The frequency of cells expressing AcGFP-CLDN and binding anti-CLDN1 serum was determined by way of flow cytometry. Data are presented as the frequency of AcGFP-CLDN-positive cells and their reactivity with anti-CLDN1 serum relative to mock transfected cells.



toma cells and human hepatocytes with polyclonal anti-CLDN1 antibodies in the absence of permeabilizing reagents demonstrated that these antibodies bind to CLDN1 expressed on the surface of primary hepatocytes and HCV permissive cell lines (Fig. 1C). To further address the specificity of antibodies, we performed CLDN1 knock-down experiments in Huh7.5.1 cells using a pool

Fig. 1. Production of antibodies directed against human CLDN1 extracellular domains using genetic immunization. (A) Specific binding of rat anti-human CLDN1 serum to CLDN1 expressed on the cell surface of transfected Bosc cells. Bosc cells were transfected with pCMV-SPORT6-CLDN1 (red histograms) or control vector (pCMV-SPORT6; black histograms). Flow cytometry of cells incubated with control serum (left panel) or anti-CLDN1 serum (right panel) demonstrated specific interaction of anti-CLDN1 antibodies with human CLDN1 (red histograms). The x and y axes show mean fluorescence intensities and relative numbers of stained cells, respectively. (B) Staining of cell surface CLDN1 on 293T/CLDN1 cells stably expressing CLDN1 by anti-CLDN1 antibodies. Flow cytometry of 293T/CLDN1 (clone IIIA6) cells (red histograms) or 293T parental cells (black histograms) incubated with control (left panel) or anti-CLDN1 (right panel) demonstrated specific interaction of anti-CLDN1 antibodies with human CLDN1. (C) Cell surface expression of CLDN1 on hepatoma cell lines or primary hepatocytes was determined by way of flow cytometry in the absence of permeabilization. Histograms corresponding to cell surface expression of CLDN1 (open curves) are overlaid with histograms of cells incubated with rat control serum (black shaded curves). (D) Imaging of cell surface CLDN1 on living Huh7.5.1 cells (left panels), permeabilized Huh7.5.1 cells (middle panels), and Caco-2 (right panels) cells by anti-CLDN1 antibodies (upper panels). Cells incubated with control serum are depicted in the lower panels. Cells were incubated with preimmune or anti-CLDN1 serum and analyzed as described in Materials and Methods. Cell nuclei were stained with DAPI.

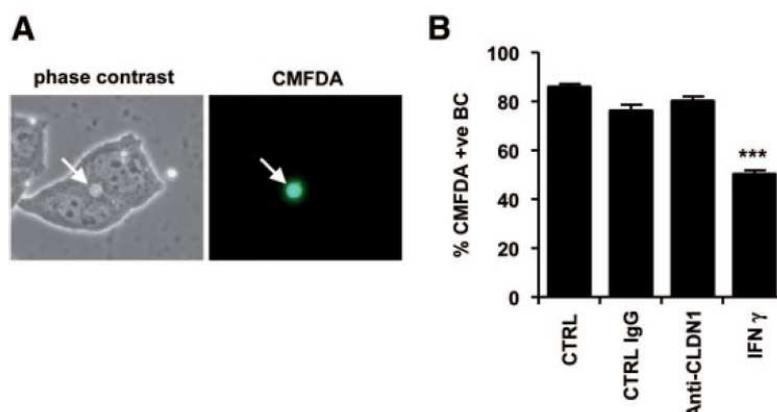


Fig. 2. Anti-CLDN1 antibodies do not alter tight junction integrity in polarized HepG2 cells. (A) The BC lumen in polarized HepG2 cells was assessed for TJ barrier function. Cells were incubated with CMFDA, with restriction of the compound to the BC, indicating that polarized HepG2 cells have functional TJs. (B) Polarized HepG2 cells grown for 3 days were treated with serum-free Dulbecco's modified Eagle's medium for 4 hours before being exposed to either control (PBS), irrelevant IgG control (1:100), anti-CLDN1 antibodies (1:100), or 10 ng/mL interferon- γ for 1 hour. TJ barrier function was measured by quantifying the number of BC retaining CMFDA compared with the total BC in a minimum of three fields of view on three replicate coverslips. *** $P < 0.0001$ (t test).

of three siRNAs described by Evans et al.⁹ CLDN1 silencing resulted in a decrease of anti-CLDN1 staining in immunoblot analyses (data not shown), further confirming the specificity of the antibodies.

Positive staining of native cell surface CLDN1 in living and nonpermeabilized Huh7.5.1 cells with anti-CLDN1 antibodies was confirmed using imaging studies. Interestingly, in living native Huh7.5.1 cells, the antibody appeared to localize to certain areas of cell-cell contacts (Fig. 1D), whereas in permeabilized Huh7.5.1 or Caco-2 cells antibody staining showed a polygonal web-like structure (Fig. 1D), which was similar to previous studies using nonneutralizing anti-CLDN1 antibodies.²³ CLDN1 staining appeared to be more pronounced in polarized Caco-2 cells than in nonpolarized Huh7.5.1 cells (Fig. 1D). Further imaging studies are ongoing to determine the detailed subcellular localization of CLDN1 recognized by neutralizing anti-CLDN1 antibodies in HCV permissive cells.

Taken together, these data demonstrate that anti-CLDN1 serum produced by genetic immunization specifically binds to the CLDN1 extracellular loops expressed on the cell surface of HCV permissive cell lines and human hepatocytes.

Anti-CLDN1 Antibodies Do Not Affect TJ Integrity. We previously reported that TJs impose a physical barrier and restrict viral access to receptors²³ and that complex hepatocyte-like polarity limits HCV entry.¹⁸ To investigate whether binding of anti-CLDN1 antibodies to polarized human hepatoma cells perturbed TJ integrity, we assessed the ability of TJs to restrict the paracellular diffusion of CMFDA from the BC lumen to the basolateral medium (barrier func-

tion) as described.¹⁸ As shown in Fig. 2, the capacity of BC lumens to retain CMFDA was similar in polarized HepG2 cells treated with rat anti-CLDN1 antibodies, rat control serum, or PBS, whereas CMFDA retention was reduced in interferon- γ -treated HepG2 cells (Fig. 2B). These data suggest that anti-CLDN1 antibodies have no effect on TJ integrity.

Neutralization of HCV Infection by Anti-CLDN1 Antibodies. To investigate whether anti-CLDN1 antibodies could inhibit HCV infection, Huh7.5.1 cells were infected with chimeric J6/CF-JFH1 firefly luciferase reporter virus (Luc-Jc1)^{26,29} in the presence of anti-CLDN1 or control antibodies. Fig. 3A shows that anti-CLDN1 serum inhibits Luc-Jc1 infection of Huh7.5.1 cells in a dose-dependent manner, whereas the control preimmune serum had no inhibitory effect. Neutralization of HCVcc infection correlated with binding of antibodies to the target cell line (Fig. 3B). To confirm that inhibition of Luc-Jc1 infection was mediated by anti-CLDN1 antibodies, we purified IgG from rat anti-CLDN1 and preimmune serum. As shown in Fig. 3C, anti-CLDN1 IgG but not control IgG markedly inhibited Luc-Jc1 HCVcc infection in a dose-dependent manner. These data demonstrate that the inhibitory effect of anti-CLDN1 serum was mediated by anti-CLDN1 IgG and not by other substances present in the serum. Infection experiments using primary human hepatocytes and HCVpp packaged with envelope glycoproteins from genotypes 1-4 demonstrated that anti-CLDN1 blocking activity was similar for infection with HCV-bearing envelope proteins of other genotypes (Fig. 3D). Taken together, these findings demonstrate that antibodies directed against the CLDN1

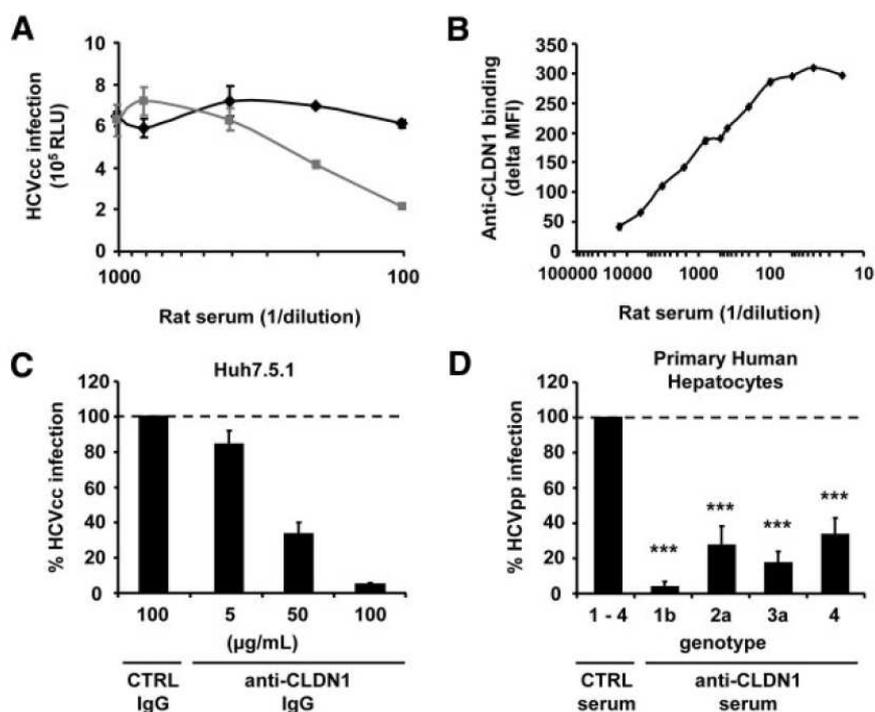


Fig. 3. Dose-dependent inhibition of HCVcc infection by anti-CLDN1 antibodies. (A) Inhibition of Luc-Jc1 HCVcc infection by rat anti-CLDN1 serum. Huh7.5.1 cells were preincubated with serial dilutions of rat anti-CLDN1 serum or control rat serum for 1 hour at 37°C before infection with Luc-Jc1 HCVcc for 4 hours at 37°C. HCV infection was assessed by measurement of luciferase activity 48 hours after infection. Means \pm SD from a representative experiment performed in triplicate are shown. (B) Binding of anti-CLDN1 antibodies to Huh7.5.1 cells. Huh7.5.1 cells were incubated with decreasing dilutions of anti-CLDN1 antibodies and binding of anti-CLDN1 was determined by flow cytometry as described in Fig. 1. (C) Jc1 HCVcc infection in the presence of purified rat anti-CLDN1 IgG. Huh7.5.1 cells were preincubated for 1 hour at 37°C with serial dilutions of IgG isolated from rat anti-CLDN1 or control serum before infection with Jc1 HCVcc. Forty-eight hours later, HCV infection was analyzed by quantitation of HCV RNA using reverse-transcription polymerase chain reaction in intracellular lysates. Results are expressed as percent of HCVcc infectivity in the absence of antibody. Means \pm SD from a representative experiment performed in triplicate are shown. (D) Inhibition of HCVpp infection in primary human hepatocytes by anti-CLDN1 antibodies. One day after isolation and plating, hepatocytes were washed and preincubated with rat anti-CLDN1 or control serum (1/50) for 1 hour at 37°C in medium. Then, HIV-based HCVpp bearing envelope glycoproteins of strains HCV-J (genotype 1b), JFH-1 (genotype 2a), UKN3A.1.28 (genotype 3a), and UKN4.21.16 (genotype 4) were added for 3 hours at 37°C. Following infection, the supernatant was removed and replaced by fresh medium. HCVpp infection was assessed by measurement of luciferase activity 72 hours after infection. Inhibition of HCVpp infection is shown as percent infection compared with hepatocytes incubated with control serum (100%). *** $P < 0.0001$.

extracellular loops inhibit HCV infection in HCV permissive cell lines and human hepatocytes.

CLDN1 Acts Cooperatively with CD81 and SR-BI in HCV Entry. We previously demonstrated that CD81 and SR-BI act in concert to mediate HCV entry.²⁶ To investigate whether the three host factors CLDN1, CD81, and SR-BI act in a cooperative manner, we added low concentrations of anti-receptor antibodies simultaneously prior to HCV infection. The use of antibody concentrations that submaximally blocked HCV infection allowed us to observe additive or synergistic effects. First, we determined the ability of combinations of two out of the three antibodies to neutralize HCVcc infection. Fig. 4 shows an additive effect of the concomitant blocking of both CD81 and CLDN1 (Fig. 4B), SR-BI and CLDN1 (Fig. 4C), or CD81 and SR-BI (Fig. 4D). This

effect was not observed when control IgG or control serum was used in combination with anti-CLDN1 antibodies (data not shown). Next, we assessed the impact of synchronously blocking all three host cell factors on HCVcc infection. Fig. 4E shows an additive effect of the three antibodies used. Indeed, Luc-Jc1 HCVcc infection was inhibited by more than 90% after simultaneous blocking of three host cell factors at antibody concentrations that inhibited HCVcc infection between 15% and 60% when used individually. Taken together, these results suggest that CLDN1 mediates HCV entry in cooperation with CD81 and SR-BI.

CLDN1 Mediates an HCV Entry Step Closely Linked to HCV-CD81 Interaction. To investigate the role of CLDN1 in the entry process, we investigated the inhibitory capacity of anti-CLDN1 antibodies in kinetic

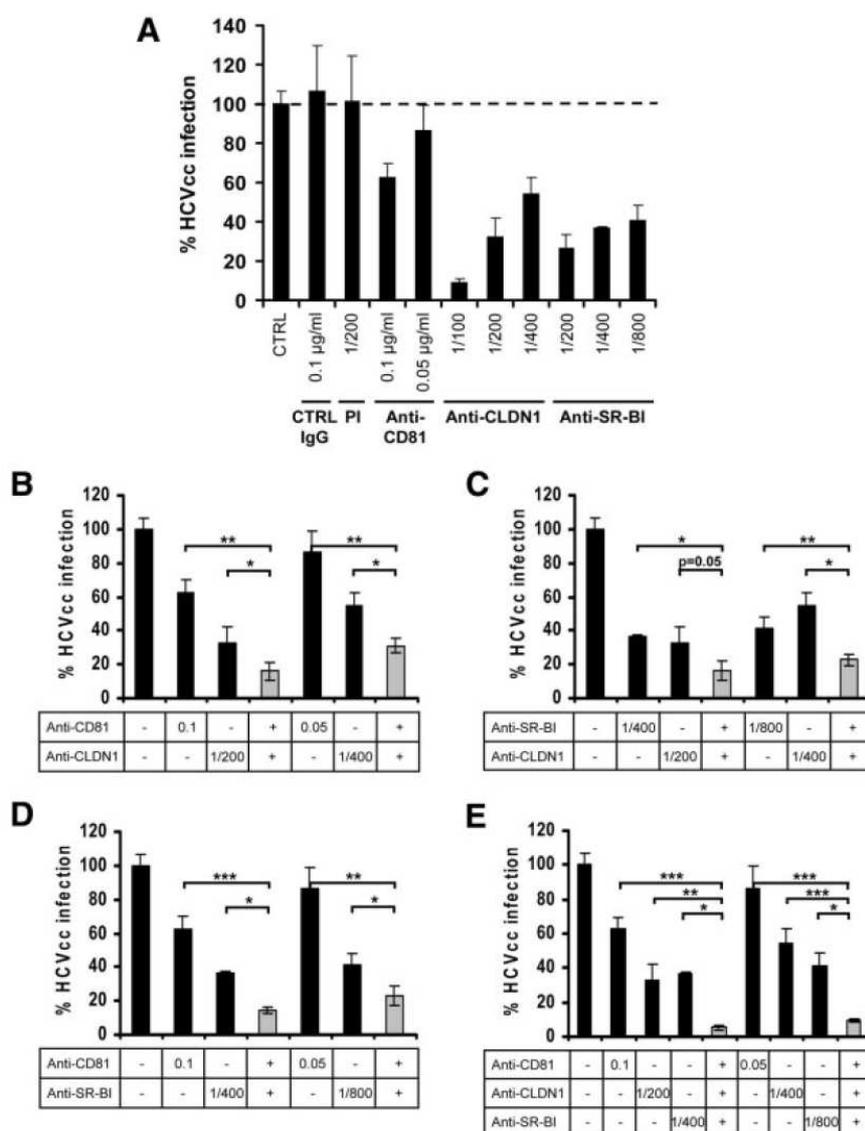


Fig. 4. CLDN1, CD81, and SR-BI act in concert to mediate HCVcc entry. (A) Dose-dependent inhibition of Luc-Jc1 HCVcc infection by anti-CLDN1, anti-CD81, and anti-SR-BI antibodies. Huh7.5.1 cells were preincubated for 1 hour at 37°C with control mouse IgG (0.1 μ g/ml), control rat preimmune serum (1/200), anti-CD81 antibody JS-81 (0.1 and 0.05 μ g/ml), rat anti-CLDN1 serum (1/100, 1/200, 1/400) or rat anti-SR-BI serum (1/200, 1/400, and 1/800) before infection with Luc-Jc1 HCVcc for 4 hours at 37°C. HCV infection was assessed by measurement of luciferase activity 48 hours after infection. Data are expressed as percent of Luc-Jc1 HCVcc infectivity in the absence of antibodies. (B-E) Additive effects of anti-CD81 and anti-CLDN1 (panel B), anti-SR-BI and anti-CLDN1 (panel C), anti-CD81 and anti-SR-BI (panel D), and anti-CD81, anti-CLDN1, and anti-SR-BI antibodies (panel E) resulting in inhibition of HCVcc entry. Huh7.5.1 cells were preincubated for 1 hour at 37°C with rat anti-CLDN1 (1/200 and 1/400), mouse anti-CD81 JS-81 (0.1 μ g/ml and 0.05 μ g/ml), and rat anti-SR-BI (1/400 and 1/800) antibodies either alone (black bars) or in combination before infection (gray bars) with Luc-Jc1 HCVcc for 4 hours at 37°C. HCV infection was assessed as described in (A). Data are expressed as percent of Luc-Jc1 HCVcc infectivity in the absence of antibodies. Means \pm SD of four independent experiments performed in duplicate are shown. *** P < 0.0001, ** P < 0.001, * P < 0.01 (t test).

studies.^{26,29} To discriminate between virus binding and postbinding events, Luc-Jc1 HCVcc binding to Huh7.5.1 cells was performed for 1 hour at 4°C in the presence or absence of inhibitors before the temperature was shifted to 37°C to initiate synchronous infection (Fig.

5A). Fig. 5B shows that similarly to anti-CD81 and anti-SR-BI, rat anti-CLDN1 antibodies inhibited Luc-Jc1 HCVcc infection when added following binding of the virus to the target cell (Fig. 5B). To fine-map the entry step mediated by CLDN1, we added antibodies in side-

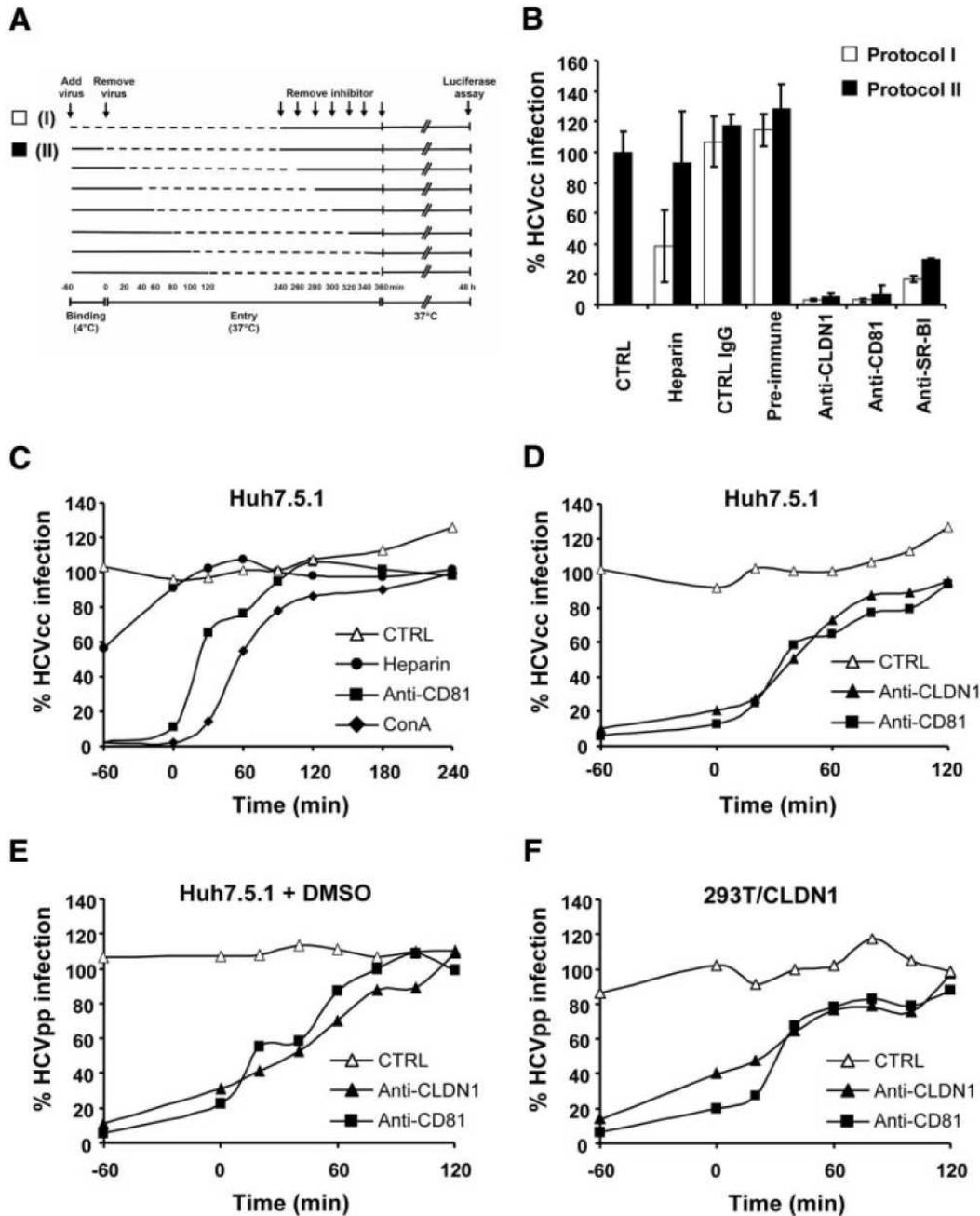


Fig. 5. Kinetics of HCVcc and HCVpp entry demonstrate that CLDN1 mediates an HCV entry step closely linked to CD81. (A) Schematic drawing of the experimental setup. Inhibition of Luc-Jc1 HCVcc entry into Huh7.5.1 cells by heparin (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$), control monoclonal mouse IgG (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), control rat preimmune serum (1/100), rat anti-CLDN1 serum (1/100), mouse monoclonal anti-CD81 antibody JS-81 (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and rat anti-SR-BI serum (1/100) was compared using different protocols as described in Materials and Methods. Dashed lines indicate the time intervals where inhibitors or antibodies were present. All results are expressed as percent Luc-Jc1 HCVcc infectivity in the absence of inhibitory compound or antibody (CTRL). Virus binding to target cells was performed in the presence (protocol I) or absence (protocol II) of compounds as described in Materials and Methods. (B) Kinetics of HCVcc entry into human hepatoma cells by compared protocol I and II. Means \pm SD of three independent experiments performed in duplicate are shown. (C) Kinetics of HCVcc infection into human hepatoma cells in the presence of heparin (an attachment inhibitor), anti-CD81 antibody, and concanamycin A (an inhibitor of endocytosis). Kinetics of HCVcc entry in the presence of heparin (\bullet), anti-CD81 (JS-81) antibody (\blacksquare), concanamycin A (\blacklozenge) (conA; 25 nM), or control rat preimmune serum (CTRL) (\triangle) was determined as described.^{6,26,29,30} Means of three independent experiments performed in triplicate are shown. (D, E) Kinetics of HCVcc entry into non-differentiated (D) or DMSO-differentiated (E) Huh7.5.1 cells. The efficiency of infection using rat anti-CLDN1 serum (\blacktriangle), anti-CD81 (JS-81) antibody (\blacksquare), or control rat preimmune serum (CTRL) (\triangle) was measured by luciferase assay 48 hours later. Means of three independent experiments performed in triplicate are shown. (F) Kinetics of HCVpp entry in stably transfected 293T/CLDN1+ cells expressing CLDN1 (as shown in Fig. 1B) using anti-CD81 (JS-81), anti-CLDN1 or control antibodies. Means of three independent experiments performed in triplicate are shown.

Table 2. Half-Maximal Times ($t_{1/2}$) Required for Heparin, Concanamycin A, and Anti-Receptor Antibodies to Inhibit HCVcc Entry in Kinetic Studies

Compound	Half-Maximal Time (minutes)	Significance (P Value)
Heparin	-60 ± 0	<0.05
Anti-CD81 (JS-81)	+30 ± 10	0.643
Anti-CLDN1	+33 ± 6	Reference
Concanamycin A	+60 ± 10	<0.05

Half-maximal times $t_{1/2}$ derived from kinetic assays shown in Fig. 5 are indicated. Values are means ± SD from three independent experiments. Student *t* test was used to analyze differences in $t_{1/2}$ for heparin, CD81, and concanamycin A compared with $t_{1/2}$ for anti-CLDN1 antibodies. *P* < 0.05 was considered statistically significant.

by-side experiments every 20 minutes for up to 120 minutes after viral binding (Fig. 5C). The half-maximal times ($t_{1/2}$) required for anti-CD81 and anti-CLDN1 antibodies to inhibit HCV entry were +30 and +33 minutes (Fig. 5C-E, Table 2), whereas the half-maximal time for heparin was -60 minutes and for concanamycin A was +60 minutes (Fig. 5C, Table 2). The time-course of anti-CLDN1 and anti-CD81 antibody-mediated inhibition was not significantly different, and both differed from those observed with heparin and concanamycin A (Table 2). Similar results were obtained in dimethyl sulfoxide-differentiated Huh7.5.1²⁷ cells (Fig. 5E). These data support a model where CLDN1 and CD81 exert their effects at a similar time in the viral internalization process.

Using Flag-tagged CLDN1 transfected 293T cells, Evans et al.⁹ reported that anti-Flag inhibition of HCVpp infection occurred at later time points compared with a CD81-specific antibody. These results differ from those obtained in this study that may be attributable to the experimental systems used in the two studies, including 293T/CLDN1 versus Huh7.5.1 cell lines, HCVpp versus HCVcc, the strain of HCV envelope glycoproteins H77 versus J6/JFH1, and the blocking antibodies (anti-CLDN1 versus anti-Flag antibodies). To further address this question, we studied the kinetics of anti-CLDN1 and anti-CD81 inhibition of HCVpp infection in 293T/CLDN1 cells. Inhibition of HCVpp infection of 293T/CLDN1 cells by anti-CLDN1 and anti-CD81 demonstrated similar kinetics (Fig. 5F) to those observed for HCVcc infection of Huh7.5.1 cells (Fig. 5D,E). Thus, the different kinetic results described by Evans et al.⁹ and us are most likely not related to the experimental model system but rather are related to the insertion of a Flag tag into CLDN1.⁹

Anti-CLDN1 Antibodies Inhibit Binding of Envelope Glycoprotein E2 to HCV-Permissive Cells in the Absence of CLDN1-E2 Interactions. Next, we investigated whether anti-CLDN1 antibodies could interfere with E2 binding to permissive cell lines. Binding studies were performed using recombinant E1 and E2 glycoproteins in the

presence of anti-receptor or control antibodies. As shown in Fig. 6B, anti-CD81, anti-SR-BI and anti-CLDN1 antibodies inhibited the binding of E2 to Huh7.5.1 cells. In contrast, preimmune or unrelated control serum had no effect (Fig. 6A-C). Similar results were obtained for antibody inhibition of E2 binding to BRL-3A rat hepatocyte-derived cells engineered to express the three human entry cofactors, SR-BI, CD81, and CLDN1²⁴ (Fig. 6E). Expression of SR-BI, CD81, and CLDN1 on the cell surface of stably transfected BRL-3A cells was confirmed by flow cytometry, and expression levels were comparable to Huh7 cells (data not shown and Dreux et al.²⁴). Interestingly, the magnitude of inhibition of E2 binding to Huh7.5.1 cells (Fig. 6C) correlated with the magnitude of inhibition of HCV infection (Fig. 3B), suggesting that inhibition of binding of E2-cell surface interactions provides a mechanism of action for the neutralizing activity of the anti-CLDN1 antibodies. In contrast, E1 binding was not affected by anti-CLDN1 (Fig. 6D). To investigate whether inhibition of E2 binding resulted in an inhibition of binding of infectious virions, we studied cellular binding of Jc1 HCVcc in the presence of anti-CLDN1 antibodies. Although HCVcc binding analyses were characterized by a higher interassay variability compared with E2 binding studies, anti-CLDN1 antibodies markedly and significantly inhibited HCVcc binding to Huh7.5.1 cells (Fig. 6F).

To study whether antibody inhibition of E2 binding to permissive cell lines was attributable to CLDN1 interactions with E2, we investigated whether CLDN1 was able to bind recombinant truncated glycoprotein E2. To address this question, CHO cells were engineered to express human CLDN1, SR-BI, or CD81 (Fig. 7A). Cell surface expression of human CD81 or human SR-BI conferred E2 binding to CHO cells (Fig. 7B), whereas CLDN1 expression had no effect (Fig. 7B). These data suggest that CLDN1 does not interact directly with HCV envelope glycoprotein E2 and that antibody blocking of E2-cell surface interactions may be mediated by indirect mechanisms.

Anti-CLDN1 Antibodies Inhibit CLDN1-CD81 Coreceptor Associations. Because anti-CLDN1 inhibits E2 binding to HCV permissive cells in the absence of a direct CLDN1-E2 interaction (Fig. 7B), we hypothesized that anti-CLDN1 antibodies may interfere with CD81-CLDN1 coreceptor complexes. To assess whether anti-CLDN1 antibodies alter CLDN1-CD81 association, 293T cells were transfected to express AcGFP-CD81 and DsRED-CD81, AcGFP-CLDN1 and DsRED-CD81, or AcGFP-CLDN1 and DsRED-CLDN1,¹⁷ incubated with preimmune and anti-CLDN1 serum (1/100 and 1/400) and coreceptor interactions analyzed by fluorescence resonance energy transfer (FRET). As shown in Fig. 8, anti-CLDN1 antibodies significantly reduced FRET between CD81 and CLDN1 in a dose-dependent manner. Preincubation of cells with control

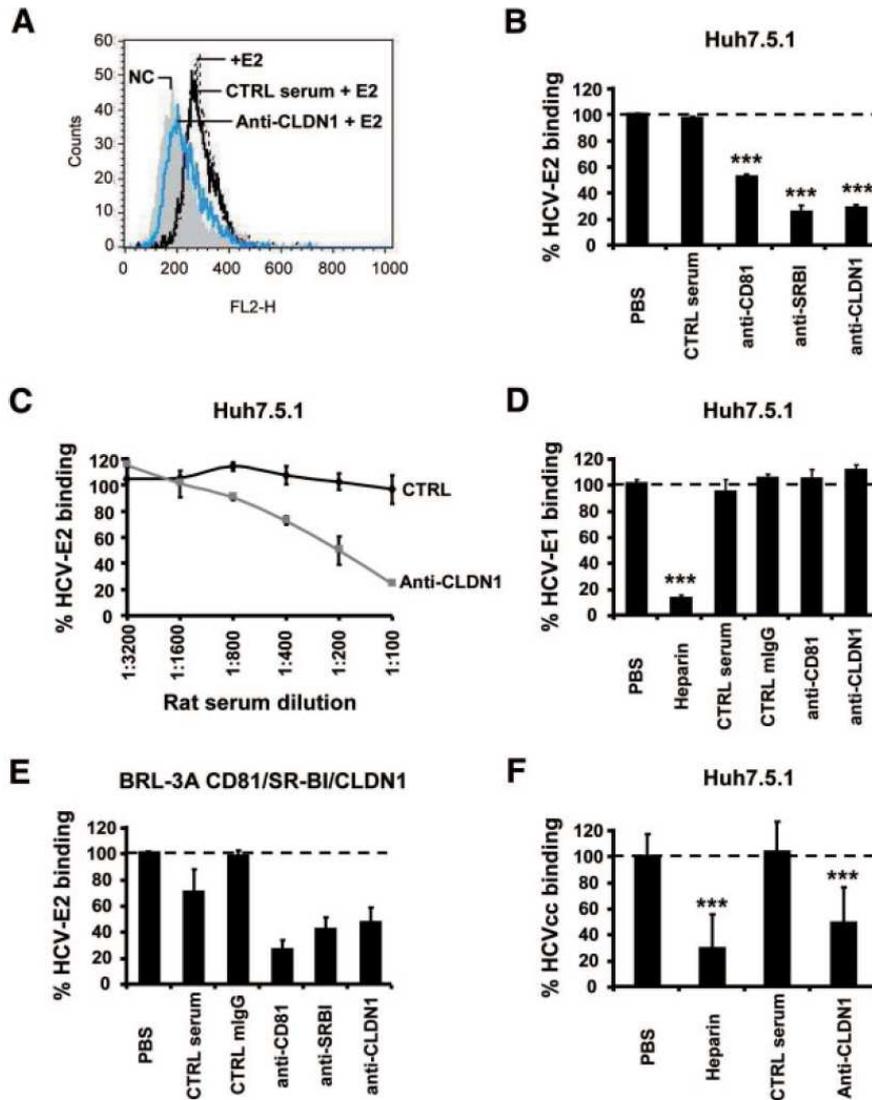


Fig. 6. Dose-dependent inhibition of E2 binding to permissive cell lines by anti-CLDN1 antibodies. (A) Binding of recombinant E2 glycoprotein to permissive Huh7.5.1 cells. Huh7.5.1 cells were preincubated with control rat preimmune serum (black lined histograms) or rat anti-CLDN1 antibodies (blue lined histograms) diluted 1/100 for 1 hour at room temperature. Binding of E2 was detected by way of flow cytometry as described in Materials and Methods. Cells incubated in the absence of antibody and E2 (PBS) served as negative control (NC; light shaded histograms). A representative experiment is shown. (B) Binding of recombinant E2 glycoprotein to permissive Huh7.5.1 cells. Huh7.5.1 cells were preincubated with rat anti-CD81, rat anti-SR-BI, and rat anti-CLDN1 antibodies or control rat preimmune serum (all diluted 1/100) for 1 hour at room temperature. Binding of E2 was detected by way of flow cytometry as described in Materials and Methods. Results are expressed as percent E2 binding in the absence of antibodies (PBS). Means \pm SD of four independent experiments performed in duplicate are shown. (C) Dose-dependent inhibition of E2 binding to Huh7.5.1 cells by anti-CLDN1. Huh7.5.1 cells were preincubated with different dilutions of anti-CLDN1 (\blacksquare) antibodies or control rat preimmune serum (\blacklozenge). Results are expressed as percent E2 binding in the absence of antibodies. Means \pm SD of four independent experiments performed in duplicate are shown. (D) Binding of recombinant E1 glycoprotein to permissive Huh7.5.1 cells. Huh7.5.1 cells were preincubated with heparin, mouse anti-CD81 (JS-81; 5 μ g/mL), control mouse IgG (5 μ g/mL), rat anti-CLDN1 (1/100), rat preimmune serum (1/100) for 1 hour at room temperature. Binding of E1 was detected by way of flow cytometry as described.^{6,26,29} Results are expressed as percent E1 binding in the absence of antibodies (PBS). Means \pm SD of two independent experiments performed in duplicate are shown. (E) Binding of recombinant E2 glycoprotein to rat BRL-3A cells stably expressing human SR-BI, CD81, and CLDN1.²⁴ Cells were preincubated with mouse anti-CD81 (JS-81, 5 μ g/mL), control mouse IgG (5 μ g/mL), rat anti-SR-BI, rat anti-CLDN1 or rat control serum (all diluted at 1/100) and binding of E2 was detected using fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-His antibody and flow cytometry as described in panel (B). Results are expressed as percent E2 binding in the absence of antibodies (PBS). Means \pm SD of two independent experiments performed in duplicate are shown. (F) Inhibition of HCVcc binding to permissive Huh7.5.1 cells by anti-CLDN1. Huh7.5.1 cells were preincubated with heparin (250 μ g/mL), rat anti-CLDN1, or control (CTRL) serum (all diluted 1/50) for 1 hour at 37°C prior to incubation with HCVcc (Jc1 strain) which had been partially purified from cell culture supernatants using gradient ultracentrifugation. Following incubation with HCVcc, nonbound HCVcc were removed by washing of cells with PBS. Binding of HCVcc was then quantified by reverse-transcription polymerase chain reaction of cell-bound HCV RNA as described,¹¹ which is indicated on the y axis. Means \pm SD of five independent experiments performed in triplicate are shown. *** $P < 0.0001$.

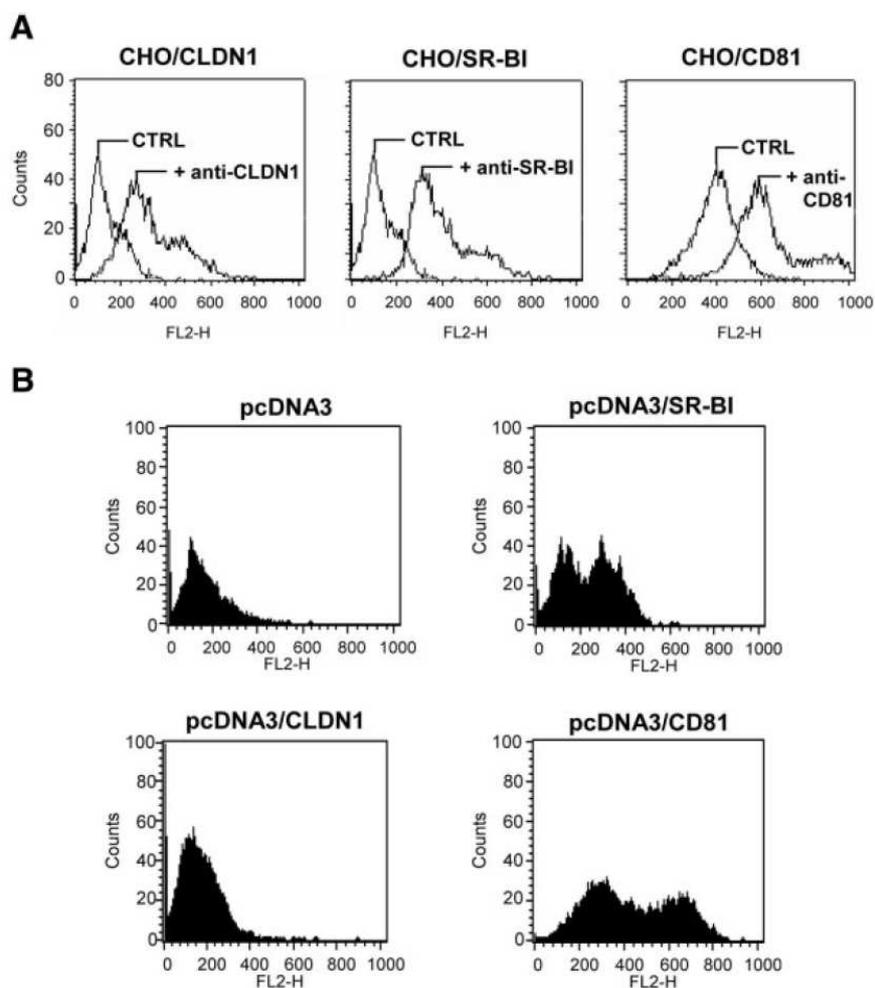


Fig. 7. Cellular binding of envelope glycoprotein E2 to CHO cells expressing CD81 and SR-BI but not CLDN1. (A) Expression of human entry factors in transfected CHO cell. CHO cells were transfected with expression plasmids encoding human CLDN1, SR-BI, or CD81 as described in Materials and Methods. Transfected CHO cells were analyzed by flow cytometry using rat control (CTRL), rat anti-CLDN1 (left panel), rat anti-SR-BI (middle panel) or mouse control IgG and anti-CD81 antibody (JS-81; right panel). (B) Binding of envelope glycoprotein E2 to CHO cells expressing human HCV entry factors. CHO cells were transfected with individual expression plasmids encoding for human CLDN1, SR-BI, or CD81 as indicated. Cellular E2 binding was analyzed by way of flow cytometry as described.³¹ A representative experiment performed in duplicate is shown.

serum did not modify CD81-CLDN1 coreceptor interactions. Inhibition of CD81-CLDN1 coreceptor interaction was specific as shown by the unchanged FRET between CD81-CD81 and CLDN1-CLDN1 following preincubation with anti-CLDN1 serum. Taken together, these data suggest that anti-CLDN1 antibodies interfere with CD81-CLDN1 heterodimer association.

Discussion

For the first time, we report the genesis and characterization of antibodies directed against the extracellular loops of human CLDN1 that inhibit HCV infection. CLDN1 showed no evidence for a direct association with

the viral envelope E1E2 glycoproteins, and yet anti-CLDN1 serum inhibited E2 association with the cell surface and disrupted CD81-CLDN1 interactions. These data suggest a role for CD81-CLDN1 complexes in viral entry and highlight new antiviral strategies targeting co-receptor complex formation.

CLDN1 is an essential cofactor conferring HCV entry⁹; however, the precise role of CLDN1 in the multistep entry process remains poorly understood. Using antibodies directed against CLDN1 EL, we demonstrate a dose-dependent inhibition of viral envelope association with HCV permissive cell lines. Using transfected CHO cells expressing human HCV entry factors, we demonstrate

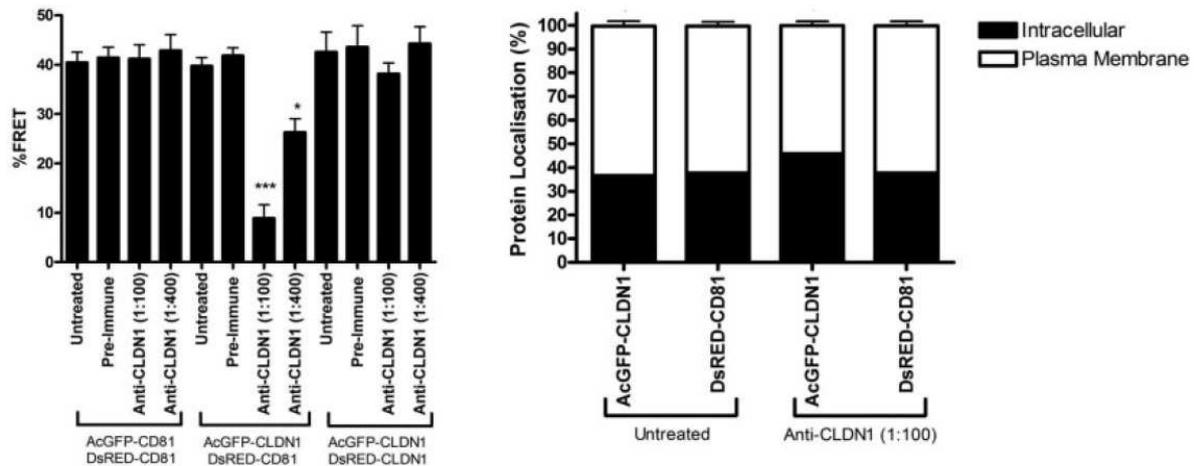


Fig. 8. Anti-CLDN1 mediated inhibition of CD81-CLDN1 coreceptor association using FRET analysis. 293T cells cotransfected to express AcGFP-CD81 and DsRED-CD81, AcGFP-CLDN1 and DsRED-CD81, or AcGFP-CLDN1 and DsRED-CLDN1 were seeded onto glass coverslips and treated with preimmune or anti-CLDN1 sera for 1 hour. Cells were fixed, imaged by laser scanning confocal microscopy and FRET between AcGFP donor and DsRED acceptor proteins measured. % FRET is defined as the frequency of pixels demonstrating FRET relative to the total number of pixels analyzed at the plasma membrane of 10 cells. *** $P < 0.0001$, * $P < 0.01$. AcGFP-CLDN1 and DsRED-CD81 at intracellular (black) and plasma membrane (white) locations in untreated and anti-CLDN1 treated cells were quantified (left panel) and the percentage of CLDN1 at each location determined (right panel).

that in contrast to CD81 and SR-BI, CLDN1 does not directly interact with envelope glycoprotein E2 at the cell surface.

Using a recent FRET-based system to study CD81-CLDN1 coreceptor association,¹⁷ we demonstrate that neutralizing anti-CLDN1 antibodies specifically disrupt CD81-CLDN1 FRET (Fig. 8). These data suggest that CD81-CLDN1 coreceptor complexes are critical for HCV entry, and CLDN1 may potentiate CD81 association with HCV particles by way of E2 interactions. The functional relevance of the CD81-CLDN1 coreceptor complex for HCV entry is further corroborated by kinetic studies demonstrating that CD81 and CLDN1 act at a similar time point during HCV entry (Fig. 5). Although the magnitude of antibody-mediated inhibition of HCVcc infection was slightly different, the kinetics of inhibition by anti-CLDN1 and anti-CD81 antibodies were similar (Fig. 5C-F, Table 2).

Using an HCVpp kinetic assay in 293T cells expressing Flag-tagged CLDN1 and anti-Flag antibody, Evans et al.⁹ observed anti-Flag antibody inhibition of HCVpp infection at a later time point than anti-CD81, suggesting that CLDN1 has a role in late stages of the viral internalization process. Evans et al. reported that the inhibitory activity of anti-CD81 antibody was lost much earlier than the anti-Flag antibody (half-maximal inhibition at 18 and 73 minutes post-temperature shift, respectively). However, we observed a loss of anti-CLDN1 and anti-CD81 inhibitory activ-

ity at similar times (half-maximal inhibition for both antibodies at +30 and +33 minutes post-temperature shift, respectively). Comparable results using HCVpp infection of 293T/CLDN1 cells (Fig. 5F) suggest that the differences between the two studies relate to the inserted Flag epitope in CLDN1 sequence or the use of an anti-Flag antibody. It is conceivable that insertion of a triple Flag epitope into CLDN1 EL1⁹ may alter CLDN1 trafficking and possible association with CD81 resulting in a delayed inhibition of infection by anti-Flag antibody⁹ compared with antibodies targeting native CLDN1. We conclude that CLDN1 and CD81 entry factors act in a cooperative manner in a closely linked step during HCV entry, consistent with earlier reports on CD81-CLDN1 association.¹⁷⁻¹⁹

Taken together, our findings support a model in which viral attachment and interaction with glycosaminoglycans and SR-BI promote or facilitate viral interaction with CD81-CLDN1 complexes. Because anti-CLDN1 antibodies inhibit envelope glycoprotein E2 and virion binding to permissive cells in the absence of any detectable CLDN1-E2 interactions, it is conceivable that CLDN1 association with CD81 enhances viral glycoprotein associations to the HCV coreceptor complex that are required for virus internalization. These results define the function of CLDN1 in the HCV entry process and highlight new antiviral strategies targeting E2-CD81-CLDN1 interactions.

The development of neutralizing anti-CLDN1 antibodies may provide new therapeutic options for the prevention of HCV infection. Our data clearly demonstrate that CLDN1 is a target for HCV therapeutic intervention that may complement ongoing efforts to block intracellular replication events with inhibitors of the HCV proteases and polymerase.⁹ The observation that anti-CLDN1 had no effect on HepG2 permeability and TJ integrity (Fig. 2) merits further investigation into the use of anti-CLDN1 antibodies as a therapeutic for HCV infection. The production of antibodies directed against HCV entry factors such as CLDN1 may widen the future preventive and therapeutic strategies for HCV infection and may ultimately be used for the prevention of HCV infection following needle stick injury or during liver transplantation. Further efforts are underway to produce monoclonal anti-CLDN1 antibodies for that strategy.

In conclusion, our results suggest that viral entry requires the formation of a virus-coreceptor complex including HCV E2, CD81, and CLDN1. The functional mapping of E2-CD81-CLDN1 association and its impact for HCV entry has important implications for the understanding of the very first steps of HCV infection and the development of novel antiviral strategies targeting viral entry.

Acknowledgments: We thank F. V. Chisari (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA) for the gift of Huh7.5.1 cells, T. Wakita (National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan), and R. Bartenschlager (University of Heidelberg, Heidelberg, Germany) for providing plasmids for production of recombinant HCV Jc1 and JFH-1 HCVpp; J. Ball (University of Nottingham, Nottingham, U. K.) for providing HCV UKN strains; C. Rice (Rockefeller University, New York City, NY) for providing chimeric CLDN1/7 expression plasmids; P. Bachellier and P. Pessaux (Pôle des Pathologies Digestives Hépatiques et Transplantation, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg) for providing liver specimens for isolation of human hepatocytes; and M. Parnot and M. Bastien-Valle for excellent technical assistance (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U748, Strasbourg, France).

References

- Guidotti LG, Chisari FV. Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis. *Annu Rev Pathol* 2006;1:23-61.
- Tai AW, Chung RT. Treatment failure in hepatitis C: mechanisms of non-response. *J Hepatol* 2009;50:412-420.
- Helle F, Dubuisson J. Hepatitis C virus entry into host cells. *Cell Mol Life Sci* 2008;65:100-112.
- Timpe JM, McKeating JA. Hepatitis C virus entry: possible targets for therapy. *Gut* 2008;57:1728-1737.
- Pestka JM, Zeisel MB, Blaser E, Schurmann P, Bartosch B, Cosset FL, et al. Rapid induction of virus-neutralizing antibodies and viral clearance in a single-source outbreak of hepatitis C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:6025-6030.
- Haberstroh A, Schnober EK, Zeisel MB, Carolla P, Barth H, Blum HE, et al. Neutralizing host responses in hepatitis C virus infection target viral entry at postbinding steps and membrane fusion. *Gastroenterology* 2008;135:1719-1728.
- von Hahn T, Yoon JC, Alter H, Rice CM, Rehermann B, Balfe P, et al. Hepatitis C virus continuously escapes from neutralizing antibody and T-cell responses during chronic infection in vivo. *Gastroenterology* 2007;132:667-678.
- Zeisel MB, Cosset FL, Baumert TF. Host neutralizing responses and pathogenesis of hepatitis C virus infection. *HEPATOLOGY* 2008;48:299-307.
- Evans MJ, von Hahn T, Tschernie DM, Syder AJ, Panis M, Wolk B, et al. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* 2007;446:801-805.
- Liu S, Yang W, Shen L, Turner JR, Coyne CB, Wang T. Tight junction proteins claudin-1 and occludin control hepatitis C virus entry and are downregulated during infection to prevent superinfection. *J Virol* 2009;83:2011-2014.
- Ploss A, Evans MJ, Gaysinskaya VA, Panis M, You H, de Jong YP, et al. Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature* 2009;457:882-886.
- Meertens L, Bertaux C, Cukierman L, Cormier E, Lavillette D, Cosset FL, et al. The tight junction proteins claudin-1, -6, and -9 are entry cofactors for hepatitis C virus. *J Virol* 2008;82:3555-3560.
- Zheng A, Yuan F, Li Y, Zhu F, Hou P, Li J, et al. Claudin-6 and claudin-9 function as additional coreceptors for hepatitis C virus. *J Virol* 2007;81:12465-12471.
- Van Itallie CM, Anderson JM. Claudins and epithelial paracellular transport. *Annu Rev Physiol* 2006;68:403-429.
- Krause G, Winkler L, Mueller SL, Haseloff RF, Piontek J, Blasig IE. Structure and function of claudins. *Biochim Biophys Acta* 2008;1778:631-645.
- Cukierman L, Meertens L, Bertaux C, Kajumo F, Dragic T. Residues in a highly conserved claudin-1 motif are required for hepatitis C virus entry and mediate the formation of cell-cell contacts. *J Virol* 2009;83:5477-5484.
- Harris HJ, Farquhar MJ, Mee CJ, Davis C, Reynolds GM, Jennings A, et al. CD81 and claudin 1 coreceptor association: role in hepatitis C virus entry. *J Virol* 2008;82:5007-5020.
- Mee CJ, Harris HJ, Farquhar MJ, Wilson G, Reynolds G, Davis C, et al. Polarization restricts hepatitis C virus entry into HepG2 hepatoma cells. *J Virol* 2009;83:6211-6221.
- Yang W, Qiu C, Biswas N, Jin J, Watkins SC, Montelaro RC, et al. Correlation of the tight junction-like distribution of Claudin-1 to the cellular tropism of hepatitis C virus. *J Biol Chem* 2008;283:8643-8653.
- Kovalenko OV, Yang XH, Hemler ME. A novel cysteine cross-linking method reveals a direct association between claudin-1 and tetraspanin CD9. *Mol Cell Proteomics* 2007;6:1855-1867.
- Zhong J, Gastaminza P, Cheng G, Kapadia S, Kato T, Burton DR, et al. Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:9294-9299.
- Pear WS, Nolan GP, Scott ML, Baltimore D. Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:8392-8396.
- Mee CJ, Grove J, Harris HJ, Hu K, Balfe P, McKeating JA. Effect of cell polarization on hepatitis C virus entry. *J Virol* 2008;82:461-470.
- Dreux M, Dao Thi VL, Fresquet J, Guerin M, Julia Z, Verney G, et al. Receptor complementation and mutagenesis reveal SR-BI as an essential HCV entry factor and functionally imply its intra- and extra-cellular domains. *PLoS Pathog* 2009;5:e1000310.

25. Sainz B Jr, Chisari FV. Production of infectious hepatitis C virus by well-differentiated, growth-arrested human hepatoma-derived cells. *J Virol* 2006;80:10253-10257.
26. Zeisel MB, Koutsoudakis G, Schnober EK, Haberstroh A, Blum HE, Cosset FL, et al. Scavenger receptor class B type I is a key host factor for hepatitis C virus infection required for an entry step closely linked to CD81. *HEPATOLOGY* 2007;46:1722-1731.
27. Codran A, Royer C, Jaeck D, Bastien-Valle M, Baumert TF, Kieny MP, et al. Entry of hepatitis C virus pseudotypes into primary human hepatocytes by clathrin-dependent endocytosis. *J Gen Virol* 2006;87:2583-2593.
28. Barth H, Schnober EK, Neumann-Haefelin C, Thumann C, Zeisel MB, Diepolder HM, et al. Scavenger receptor class B is required for hepatitis C virus uptake and cross-presentation by human dendritic cells. *J Virol* 2008;82:3466-3479.
29. Koutsoudakis G, Kaul A, Steinmann E, Kallis S, Lohmann V, Pietschmann T, et al. Characterization of the early steps of hepatitis C virus infection by using luciferase reporter viruses. *J Virol* 2006;80:5308-5320.
30. Tscherne DM, Jones CT, Evans MJ, Lindenbach BD, McKeating JA, Rice CM. Time- and temperature-dependent activation of hepatitis C virus for low-pH-triggered entry. *J Virol* 2006;80:1734-1741.
31. Barth H, Cerino R, Arcuri M, Hoffmann M, Schurmann P, Adah MI, et al. Scavenger receptor class B type I and hepatitis C virus infection of primary tupaia hepatocytes. *J Virol* 2005;79:5774-5785.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Partie I : L'apolipoprotéine E interagit avec la protéine non-structurale NS5A du VHC et est requise pour l'assemblage des particules virales infectieuses

Avec 3% de la population mondiale infectée par le VHC, ce virus constitue un vrai problème de santé public. La cible préférentielle de ce virus est l'hépatocyte. L'infection devient chronique dans 80% des cas, et est associée à une stéatose, une fibrose qui peuvent conduire à une cirrhose voire à un hépatocarcinome. La formation d'un complexe de réplication fonctionnel implique une réorganisation des membranes du RE et le recrutement d'éléments viraux et cellulaires. Récemment, de nombreuses études ont montré que l'assemblage et la sécrétion des virions étaient étroitement liés au métabolisme lipidique des hépatocytes. En effet, dans les cellules hépatocytaires, la protéine core et les complexes de réplication du virus sont associés aux gouttelettes lipidiques (Boulant *et al.*, 2007; Miyanari *et al.*, 2007), ainsi qu'à des protéines impliquées dans le processus de maturation et de sécrétion des VLDL (Huang *et al.*, 2007a). Gastaminza *et al.*, ont d'ailleurs proposé que les virions VHCcc cooptaient la voie de sécrétion des VLDL pour leur production (Gastaminza *et al.*, 2008). Cette interrelation étroite entre le cycle de vie du VHC et le métabolisme lipidique à l'échelle de la cellule hépatocytaire peut être corrélée avec les données physiologiques concernant le métabolisme lipidique des patients infectés par ce virus (Asselah *et al.*, 2009).

L'apolipoprotéine E est un facteur d'hôte nécessaire à la production de particules infectieuses.

Des études antérieures réalisées au laboratoire ont montré en utilisant le système double hybride de levure, qu'une protéine hépatique, apoE, interagissait avec la protéine virale NS5A. En utilisant le système des VHCcc, nous avons également démontré que NS5A et apoE interagissaient dans les cellules répliquant le virus. La protéine NS5A est une protéine ancrée dans la membrane du RE. Elle est nécessaire à la réplication mais aussi à la formation des particules virales infectieuses (Appel *et al.*, 2008; Tellinghuisen *et al.*, 2005). La réplication se déroule dans des structures membranaires spécialisées, riches en lipoprotéines (Gastaminza *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2007a), dérivées de la membrane du RE qui forment des invaginations dans la lumière du RE. Le virus de la dengue, utilise également ce type d'architecture membranaire (Welsch *et al.*, 2009). Mais, à la différence du virus de la Dengue, le CR du VHC est, en plus, en étroite relation avec une organelle particulière de l'hépatocyte : la gouttelette lipidique. Cette interaction est cruciale pour l'assemblage des particules virales infectieuses VHC. Miyarani *et al.*, ont montré que la protéine NS5A interagit avec la protéine de capsid core associée aux gouttelettes lipidiques (Miyarani *et al.*, 2007; Shavinskaya *et al.*, 2007) alors que nos résultats montrent une interaction entre la protéine NS5A et apoE. Au vu de ces données, nous avons suggéré qu'apoE, présente dans la proximité des gouttelettes lipidiques, pourrait également interagir avec la protéine de capsid core. Pourtant, alors

que nous avons confirmé, par le système double hybride dans la levure, une interaction directe entre la protéine core et la protéine NS5A précédemment décrite par Miyanari et al., (Miyanari *et al.*, 2007), nous n'avons pas réussi à mettre en évidence une interaction entre apoE et core. Nous proposons donc qu'apoE interviendrait dans le processus d'assemblage à l'intérieur d'un complexe où apoE serait indirectement associée ou amenée à core via NS5A et/ou d'autres protéines.

En inhibant la synthèse d'ApoE dans les cellules Huh7.5.1 par l'utilisation d'ARNs interférents dirigés contre apoE (siApoE), la production de particules infectieuses VHCcc est fortement inhibée. Alors que la réplication du virus n'est pas affectée. De même, l'inhibition par ARN interférence d'apoE dans des cellules naïves n'a pas d'effet sur la capacité d'entrée et de réplication du virus dans ces cellules. Ces résultats suggèrent qu'apoE intervient dans une étape tardive du cycle viral.

Nous avons montré que l'association NS5A-apoE était nécessaire à la production de particules infectieuses. En utilisant des mutants de délétion de NS5A, défectifs pour la production de particules infectieuses, décrits dans deux études précédentes (Appel *et al.*, 2008; Miyanari *et al.*, 2007) nous avons montré une perte de l'interaction de NS5A avec apoE. Ces résultats suggèrent que l'interaction NS5A-apoE est nécessaire à l'assemblage des particules virales. Nos résultats confortent l'idée que la protéine NS5A est une protéine bi-fonctionnelle qui peut agir comme un interrupteur moléculaire entre la réplication et l'assemblage du virus (Huang *et al.*, 2007b).

ApoE est impliquée dans l'assemblage et la sécrétion des particules infectieuses.

Afin de définir le rôle d'apoE dans les étapes tardives du cycle viral et plus particulièrement de pouvoir distinguer entre les étapes d'assemblage et de sécrétion du virus, nous avons purifié les particules virales extra- et intra-cellulaires produites dans des cellules Huh7.5.1 répliquant le VHC en présence ou absence de siApoE, suivant 2 protocoles. Protocole A : le « silencing » d'apoE se fait 72h avant l'électroporation du génome infectieux. Protocole B : le « silencing » d'apoE se fait en même temps que l'électroporation. Dans les deux cas, il n'y a pas de production de particules infectieuses dans le surnageant des cultures cellulaires. Lors de l'analyse de l'infectivité des extraits cytoplasmiques de ces cellules (lysats cellulaires), nous avons montré que dans le cas du protocole B, il n'y a pas de particules infectieuses présentes, suggérant également un défaut dans l'assemblage du virus. A l'inverse, dans le cas du protocole A, seule une rétention des particules infectieuses dans la cellule est observée, suggérant un défaut

dans la sécrétion des particules virales. Les lysats cellulaires, issus du protocole A, contiennent quant à eux des particules infectieuses en quantité comparables à celles observée avec un siRNA contrôle. Les cellules ayant été transfectées avec les siApoE trois jours avant l'électroporation avec le génome viral (protocole A) expriment à nouveau au jour zéro une petite quantité d'apoE. Cette petite quantité d'apoE semble suffisante pour l'assemblage de particules virales infectieuses.

Nous avons voulu savoir si dans des cellules répliquant et produisant du virus, le fait d'inhiber apoE peut avoir un effet sur l'assemblage et/ou l'export de particules virales infectieuses. Pour cela, nous avons infecté (et non électroporé) des cellules Huh7.5.1 avec des VHCcc. Après trois jours de culture, ces mêmes cellules ont été transfectées avec des siApoE. Ensuite, nous avons collecté les virus sécrétés dans le surnageant de culture de ces cellules et les virions présents à l'intérieur de ces cellules et ceci durant trois jours consécutifs. Les virions récoltés ont été purifiés sur gradient de sucrose avant d'être testés pour leur infectivité sur des cellules Huh7.5.1 naïves. Nos résultats montrent un effet précoce des siApoE sur la sécrétion des virions et un effet plus tardif sur l'assemblage. En effet, dès le premier jour après transfection des siApoE, les cellules ne sécrètent plus de virus infectieux dans le milieu de culture. Cette situation perdure jusqu'au jour 3, date de l'arrêt de l'expérience. Lorsque nous analysons le nombre de particules infectieuses présentes dans le milieu intracellulaire, nous observons que durant les deux premiers jours, les cellules contiennent encore des particules virales assemblées/pré-assemblées qui ne sont plus secrétées. Au fur et à mesure du temps, le nombre de particules intracellulaires chute alors que la sécrétion est doucement restaurée.

Ces données nous permettent de proposer un modèle où apoE interviendrait comme cofacteur essentiel pour deux étapes distinctes du cycle viral, l'assemblage et l'export des virions.

Miyanari et al., ont proposé que des complexes formés de protéines non structurales (non associé au CR) pourraient jouer un rôle dans la formation de particules virales infectieuses (Miyanari *et al.*, 2007). L'interaction entre NS5A et apoE montre qu'apoE est proche des CR. Cette interaction se fait au niveau des CR ou proche des CR ou peut être dans ces structures non associée au CR, spécialisées dans une autre fonction que la réplication. Nous pouvons imaginer qu'apoE fasse le lien entre ces deux types complexes multiprotéiques via son interaction avec NS5A et pourrait ainsi servir ensuite à l'assemblage des particules virales sur le lieu d'assemblage des VLDL.

Rôle des VLDL dans assemblage

Plusieurs études récentes ont apporté la preuve que la voie de sécrétion des VLDL joue un rôle essentiel dans l'assemblage, la maturation et la sortie des virions VHC (Gastaminza *et al.*, 2008). En effet, les vésicules membranaires, où se répliquent le virus, sont très riches en protéines nécessaires à l'assemblage des VLDL tels apoB et la protéine MTP (microsomal triglycérade transfer protein) (Huang *et al.*, 2007a). De plus, Gastaminza *et al.*, ont montré en utilisant des ARN interférents, dirigés contre apoB et apoE ou des inhibiteurs de la sécrétion des VLDL ciblant la protéine MTP, que l'assemblage et la sécrétion des particules virales se faisaient vraisemblablement par cooptation de la voie de synthèse des VLDL (Gastaminza *et al.*, 2008). Nos résultats, ainsi que ceux d'autres équipes, montrent une forte implication d'apoE à la fois dans l'assemblage et la sécrétion des particules infectieuses. (Chang *et al.*, 2007; Jiang and Luo, 2009; Nielsen *et al.*, 2006). Nos résultats proposent qu'apoE intervienne de manière indépendante au cours de ces deux étapes du cycle viral (Benga *et al.*, 2010).

En plus de leur rôle crucial dans l'assemblage et la sécrétion des particules virales les apolipoprotéines associées aux virions jouent également un rôle important dans l'entrée.

Rôle des lipoprotéines dans l'entrée du VHC

Une autre étape du cycle viral est également dépendante des lipoprotéines de faible densité (VLDL et LDL) associées aux particules du VHC, cette étape est l'entrée virale. Le rôle physiologique de deux des récepteurs impliqués dans l'attachement et l'entrée du VHC, le récepteur SR-BI et le récepteur des LDL, est l'endocytose des lipoprotéines dans les cellules. Les hépatocytes expriment à leur surface ces deux récepteurs.

SR-BI joue un rôle majeur dans l'entrée du VHC dans l'hépatocyte (Bartosch *et al.*, 2003c; Kapadia *et al.*, 2007; Scarselli *et al.*, 2002; Zeisel *et al.*, 2007). De plus, les particules isolées à partir de sérums de patients infectés reconnaissent indirectement SR-BI via les lipoprotéines riches en apoB (surtout les VLDL) qui sont associés aux virions (Maillard *et al.*, 2006). Les VLDL participent à l'attachement du virus sur la cellule et protègent le virus des anticorps neutralisants dirigés contre les glycoprotéines d'enveloppe E1E2.

Les hépatocytes captent également le cholestérol plasmatique via les récepteurs aux LDL. Les LVP isolées à partir de sérum des patients infectés entrent dans les cellules hépatocytaires et dans les hépatocytes humains de manière dépendante du LDL-R (Andre *et al.*, 2002; Molina *et al.*, 2007). Il est donc concevable que, comme SR-BI, le LDL-R

puisse participer à l'entrée du virus dans la cellule via une interaction entre le récepteur et les lipoprotéines associées au VHC lors d'une étape précoce de l'entrée précédant l'interaction du virus avec CD81. Récemment, Owen et al., ont montré qu'apoE, associé aux particules virales du VHC, facilite l'infection via une interaction avec le LDL-R (Owen et al., 2009).

Métabolisme lipidique comme cible thérapeutique

Des études récentes ont révélé que l'infection par le VHC prend le contrôle du métabolisme cellulaire et conduit à une augmentation de la synthèse des acides gras (Negro and Sanyal, 2009; Syed et al., 2009). Cela fait du métabolisme lipidique une nouvelle cible thérapeutique dans la lutte contre le VHC.

Des données *in vitro* suggèrent que les statines, à l'exception de la pravastatine, inhibent la réplication de l'ARN du VHC par épuisement des lipides géranylgeranylés (Kapadia and Chisari, 2005; Ye et al., 2003). Il a été récemment démontré, *in vitro*, que la fluvastatine présente la plus forte activité antivirale, suivie par l'atorvastatine et la simvastatine (Ikeda et al., 2006). Ces drogues sont couramment utilisées pour baisser le taux de cholestérol, elles agiraient toutefois sur la réplication par un mécanisme indépendant du métabolisme lipidique (Kapadia and Chisari, 2005; Ye et al., 2003). Les premières études cliniques utilisant la fluvastatine en monothérapie chez des patients infectés ont montré des effets modestes, variables et souvent de courte durée sur la réplication virale (Bader et al., 2008). Il a tout de même été proposé que ces molécules puissent être utilisées dans le cadre d'une multi-thérapie (Delang et al., 2009). Les résultats de telles études ne sont pas encore disponibles.

Un autre type de molécule, sont connues pour inhiber l'assemblage et la sécrétion des VLDL. Ce sont des inhibiteurs de la MTP. La molécule BMS-2101038, en bloquant la MTP, permet d'inhiber la sécrétion des VLDL et accélère la dégradation d'apoB (Huang et al., 2007a). L'anti-MTP semble être efficace pour traiter l'infection par le VHC, car elle inhibe la libération de particules à partir de cellules infectées par le VHC (Huang et al., 2007a). Récemment, Jiang and Luo ont montré que cette molécule n'a pas d'effet sur la réplication du VHC (Jiang and Luo, 2009). Les anti-MTP (BMS-2101038 et CP-346086) inhibent la production d'apoB. Utilisés à faibles doses, ils observent un effet négatif sur la production d'apoB mais pas sur celle d'apoE et la production de particules virales infectieuses n'est pas inhibée. Utilisé à plus fortes doses, ces molécules ont un effet délétère sur la production d'apoB et d'apoE ainsi que sur la production de particules virales infectieuses. Les auteurs suggèrent qu'apoB n'est pas nécessaire à la production de virions, contrairement à apoE car lorsqu'ils transfectent les cellules avec apoE, ils restaurent la production de particules virales infectieuses (Jiang and Luo, 2009).

Nos résultats montrent qu'il existe une interaction étroite entre ApoE et la production de particules virales infectieuses du VHC. Une meilleure compréhension de cette interaction nous permettrait, à terme, de développer de nouvelles thérapies. Les perspectives de ce travail sont multiples.

- Dans un premier temps, nous nous intéresserons plus précisément à l'interaction apoE-NS5A. En effet, nous avons montré, dans le système de double hybride de la levure, que des mutants NS5A défectifs pour la production de particules virales infectieuses et non pour la réplication (Miyanari *et al.*, 2007) n'interagissent plus avec apoE. Par immunofluorescence et co-immunoprécipitation nous pourrions confirmer nos résultats dans la cellule infectée.
- Nous envisageons également de construire des mutants apoE afin de mieux caractériser cette interaction apoE-NS5A dans le système des VHCcc. Ces mutations portent sur les résidus différenciant les trois isoformes d'apoE mais aussi la délétion du domaine d'ancrage aux lipoprotéines ou des mutations ponctuelles décrites dans la littérature.
- La protéine NS5A est une protéine qui peut-être phosphorylée (Evans *et al.*, 2004; Tellinghuisen *et al.*, 2008a). En effet, l'état de phosphorylation de cette protéine affecte la réplication de l'ARN VHC et il existe une corrélation inverse entre les mutations adaptatives NS5A facilitant la réplication et la production de virus. Tellinghuisen *et al.*, ont récemment identifié un résidu essentiel, la Ser457, phosphorylée par une kinase cellulaire, la caséine kinase II (CKII), qui régule la production de nouvelles particules infectieuses (Tellinghuisen *et al.*, 2008a). Il serait donc intéressant de voir si la phosphorylation de NS5A a un effet sur son interaction avec apoE.
- Nous avons également proposé que l'interaction apoE-NS5A ait un rôle dans l'assemblage des virions. Nous avons supposé que cette interaction peut se faire au niveau des CR ou proche des CR dans des structures spécialisées dans une autre fonction que la réplication. Nous pourrions par l'isolement des CR après traitement à la protéinase K, regarder si l'interaction apoE-NS5A est conservée (Quinkert *et al.*, 2005). Ceci confirmerait notre hypothèse proposant que l'interaction apoE-NS5A pourrait faire le lien entre l'étape de réplication et l'étape d'assemblage. Nous pourrions suivre au cours du temps par microscopie le marquage d'apoE dans des cellules répliquant le virus VHC. Par des techniques de purification sur gradient d'iodixanol, nous proposons de fractionner des extraits

cellulaires répliquant le virus. En effet, en fonction du protocole, ces techniques permettent de séparer en différentes fractions les constituants de la cellule (le RE, l'appareil de Golgi, le réseau *trans*-golgien, les endosomes et les membranes plasmiques). Ainsi, nous pourrions détecter par western blot, en fonction de la fraction, la présence d'apoE et des autres protéines virales (NS5A, core, E1 et E2...).

- Nous pourrions également rechercher s'il existe une interaction entre apoE et les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2.
- Une perspective intéressante de ce travail serait la mise en place d'un criblage, dans le système de production de particules virales VHCcc, à l'aide d'une chimiothèque, afin d'identifier des molécules ayant une influence sur la synthèse des lipoprotéines et sur la production de particules virales infectieuses.

**Partie II : L'inhibition de l'infection du VHC par des anticorps
anti-CLDN1 est médiée par la neutralisation de l'association
E2-CD81-CLDN1**

Le VHC est un virus enveloppé, qui infecte spécifiquement l'homme et qui se transmet essentiellement par voie parentérale. Les particules circulantes sont associées aux lipoprotéines. En effet, comme nous l'avons vu dans la partie I, la morphogenèse des virions est étroitement liée au métabolisme des VLDL. L'entrée du virus dans sa cellule hôte, l'hépatocyte, est un processus complexe faisant intervenir différentes molécules. Le VHC va s'attacher, via son association avec les lipoprotéines, au LDL-R puis il utilise plusieurs récepteurs spécifiques pour entrer dans la cellule, tels SR-BI et CD81. Cependant, l'expression de ces molécules n'étant pas limitée aux hépatocytes, cela n'explique pas le tropisme du virus pour le foie. Les hépatocytes sont des cellules polarisées, avec un pôle basolatéral, en contact avec la circulation sanguine (endothélium) et un pôle apical, en contact avec la bile (canalicules biliaires) (Figure 5). Ce sont les jonctions serrées qui assurent la séparation entre ces deux domaines. Récemment, il a été montré que les protéines de jonction CLDN-1, -6 et -9 et OCLN participent également à l'entrée virale (Evans *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2009b; Meertens *et al.*, 2008; Ploss *et al.*, 2009; Zheng *et al.*, 2007), ce qui suggère que la polarité des cellules joue un rôle important dans l'entrée du VHC.

Production et caractérisation d'anticorps polyclonaux anti-CLDN1.

Nous sommes les premiers à avoir décrit la production d'anticorps polyclonaux dirigés contre les domaines extracellulaires de CLDN1 capables d'inhiber l'infection par le VHC en culture cellulaire.

La spécificité des anticorps obtenus pour le récepteur CLDN1 a été confirmée par cytométrie en flux avec des cellules de lignées hépatocytaires humaines (Huh7.5.1) et avec des hépatocytes primaires humains exprimant naturellement la protéine de jonction CLDN1 à leur surface, ainsi qu'avec des cellules CHO exprimant CLDN1 après transfection. Tous les sérums obtenus contenaient des anticorps dirigés contre la protéine d'intérêt. Pour confirmer leur spécificité, nous avons également, par la méthode des siARN, bloqué la synthèse de la protéine CLDN1 et observé que l'attachement des anticorps anti-CLDN1 était diminuée. En utilisant des cellules 293T exprimant à leur surface d'autres CLDN (CLDN1, 4, 6, 7, 9, 11, 15 et 17) appartenant toutes à la superfamille des CLDN, nous avons montré que les anticorps anti-CLDN1 sont bien spécifiques du récepteur CLDN1. Certains anticorps anti-CLDN1 reconnaissent toutefois, CLDN17 (3,4% de cellules positives sur 24,4% cellules transfectées ce qui fait un rapport de 14%). Zheng *et al.*, ont montré que CLDN17, est une protéine restreinte au rein où elle est très faiblement exprimée (Hewitt *et al.*, 2006). Cette protéine n'intervient toutefois pas dans l'entrée du VHC (Zheng *et al.*, 2007). Evans *et al.*, ont montré que la boucle EL1 était nécessaire à l'entrée du VHC dans la cellule, contrairement à la boucle

EL2. Cependant, en utilisant des protéines chimériques CLDN7/CLDN1, décrites dans la Figure 33, nos anticorps anti-CLDN1 reconnaissent la moitié N-terminale de la boucle EL1 et la petite boucle EL2. De plus, en utilisant des peptides linéaires spécifiques des domaines extracellulaires lors de tests ELISA et de tests fonctionnels en culture cellulaire, nous n'avons pas vu d'interactions spécifiques entre ces peptides et les anticorps anti-CLDN1. Nos résultats permettent de proposer que la spécificité des anticorps anti-CLDN1, dirigés spécifiquement contre les domaines extracellulaires de CLDN1, dépendent de la conformation de la protéine CLDN1.

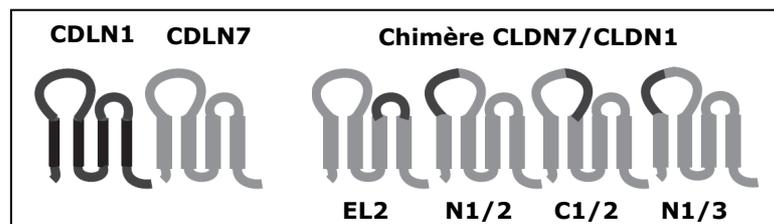


Figure 33 : Description des chimères CLDN7/CLDN1 utilisées pour la caractérisation des anticorps anti-CLDN1 (D'après Evans et al. 2007).

La protéine CLDN1 est une protéine de jonction dont le rôle est de maintenir les cellules entre elles, de réguler le trafic paracellulaire et d'assurer la polarité des cellules. Les cellules Huh7.5.1 sont peu polarisées en culture cellulaire, mais nos résultats d'immunomarquage montrent l'existence d'une répartition polygonale identique à celle retrouvée dans des cellules épithéliales polarisées telles les Caco2. De plus, lors d'immunomarquage sur cellules vivantes, les anticorps anti-CLDN1 ont tendance à se concentrer aux points de contact entre les cellules. Récemment, Cukiermann et al., ont montré que la boucle EL1 était importante pour l'entrée du virus dans la cellule et que la boucle EL2 était nécessaire pour les interactions CLDN1-CLDN1 entre les faces opposées de cellules voisines (Cukierman *et al.*, 2009). Ces résultats et nos résultats suggèrent que les anticorps anti-CLDN1 se fixent sur les protéines CLDN1 localisées au point de contact entre les cellules hépatocytaires et ce serait à cet endroit que les anticorps anti-CLDN1 interviendraient pour inhiber l'entrée du VHC.

Effet des anticorps anti-CLDN1 sur l'entrée du VHC.

Dans un but thérapeutique, nous avons sélectionné des anticorps anti-CLDN1 pouvant inhiber l'infection du VHC en utilisant le modèle d'infection en culture cellulaire VHCcc. Les sérums anti-CLDN1 sélectionnés inhibent l'infection par le VHC à hauteur de 80%. Nos résultats montrent que ces anticorps anti-CLDN1 inhibent spécifiquement et de façon dose dépendante l'infection. En effet, cette inhibition est retrouvée lorsque nous utilisons des IgG purifiées à partir de ces sérums et cette inhibition est dose-dépendante.

Ces résultats montrent que des anticorps anti-CLDN1 peuvent inhiber spécifiquement l'infection par le VHC.

Nous avons également voulu savoir si ces anticorps anti-CLDN1 étaient efficaces sur l'entrée du VHC issus de différents génotypes. Pour cela nous avons utilisé un modèle couramment utilisé au laboratoire, les pseudo-particules VHCpp. Ces particules, expriment à leur surface les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 du VHC de différents génotypes. Nous avons ainsi montré que l'entrée dans des hépatocytes primaires humains des VHCpp des génotypes les plus courants (1 à 4) était efficacement inhibée par nos anticorps anti-CLDN1.

Coopération entre les récepteurs SR-BI, CD81 et CLDN1 au cours de l'entrée virale.

Nous avons ensuite étudié le mécanisme d'entrée du VHC en utilisant des anticorps ciblant respectivement CD81, SRB1 et CLDN1. Dans un premier temps, nous avons déterminé les conditions optimales d'étude, à savoir la quantité d'anticorps nécessaire pour obtenir 50% d'inhibition d'infection. Dans un deuxième temps, nous avons combiné 2 à 2 les différents anticorps anti-CD81, anti-SR-BI, et anti-CLDN1. Nos résultats montrent que l'effet inhibiteur est additif quelque soit la combinaison utilisée. De plus, le blocage simultané des trois récepteurs conduit à une inhibition de l'infection de plus de 90% suggérant que CD81, SRB1 et CLDN1 agissent de concert lors de l'entrée du VHC dans sa cellule cible.

Le mécanisme d'entrée du VHC se déroule en deux étapes ; l'attachement du virus à la cellule via les GAGs et le récepteur des LDL, suivi de la reconnaissance spécifique entre les récepteurs cellulaires et les protéines d'enveloppe E1 et E2. Des études antérieures réalisées au laboratoire ont montré que les récepteurs SR-BI et CD81 sont des facteurs cellulaires impliqués dans l'étape de post-attachement (Zeisel *et al.*, 2007). De la même manière, nous avons suivi la cinétique d'entrée du virus en présence d'anticorps anti-CLDN1. Tout comme CD81, la protéine CLDN1 intervient dans une étape de post-attachement. Nos résultats sont confortés par des travaux publiés récemment, montrant que ces deux protéines co-localisent au niveau des membranes de cellules non polarisées (293T et Huh7.5) et de cellules polarisées (HepG2 et hépatocytes primaires humains) (Harris *et al.*, 2008; Mee *et al.*, 2009; Reynolds *et al.*, 2008).

Afin d'en savoir plus sur les mécanismes d'entrée du VHC, nous avons étudié la cinétique d'entrée du virus selon un protocole déjà bien défini et caractérisé (Koutsoudakis *et al.*, 2006; Zeisel *et al.*, 2007). Nous avons ainsi pu montrer que CLDN1 intervient en étroite relation avec CD81 après l'attachement du virus à la cellule et bien avant l'étape d'endocytose. En effet, nous avons mesuré un $t_{1/2}$ d'inhibition de l'infection

de 30 min pour les anticorps anti-CLDN1 et de 33 min pour les anti-CD81. Nos résultats ne corroborent pas ceux d'Evans et al., qui ont montré que CLDN1 intervenait après l'interaction du virus avec son récepteur CD81 (Evans *et al.*, 2007). Cependant, au moment de cette étude, il n'existait pas d'anticorps anti-CLDN1 pouvant bloquer l'entrée du virus. Ils ont donc inséré dans la séquence de la protéine CLDN1 un FLAG TAG, au niveau de la boucle EL1, pouvant ainsi être reconnu par un anticorps anti-FLAG (Evans *et al.*, 2007). Cet anticorps anti-FLAG peut bloquer l'entrée des pseudo-particules VHCpp et présente un $t_{1/2}$ d'inhibition de l'infection de 73 min. Cette différence de résultat peut s'expliquer par le fait que nous n'avons utilisé ni les mêmes types cellulaires (293T/Huh7.5.1), ni les mêmes modèles d'études de l'infection (VHCpp/VHCcc). Afin de pouvoir définitivement trancher, nous avons refait l'expérience dans les mêmes conditions qu'Evans et al., (cellules 293T exprimant CLDN1 et VHCpp) mais en utilisant nos anticorps anti-CLDN1. Dans ces conditions, nous avons obtenu les mêmes résultats que ceux que nous avons précédemment obtenus avec le modèle VHCcc sur des cellules hépatocytaires Huh7.5.1. Ainsi, la différence entre les deux études peut s'expliquer par l'insertion d'un FLAG TAG dans la séquence de la protéine CLDN1 et/ou par l'utilisation d'anticorps anti-FLAG. En effet, il est tout à fait concevable que l'insertion d'un épitope FLAG dans la boucle EL1 de CLDN1 altère le trafic de CLDN1 au niveau des membranes et/ou l'association de CLDN1 avec le co-facteur CD81, ceci entraînant un retard de l'inhibition de l'infection par les anticorps anti-FLAG.

Les anticorps anti-CLDN1 inhibent l'attachement de la glycoprotéine d'enveloppe E2 à la surface des cellules et l'interaction CLDN1-CD81

Pour entrer dans les cellules, le virus doit interagir directement via ses glycoprotéines d'enveloppe E1E2 avec ses co-facteurs d'entrée. De nombreuses études montrent une interaction directe entre E2-SR-BI et E2-CD81 (Bartosch *et al.*, 2003c; Drummer *et al.*, 2002; Pileri *et al.*, 1998; Scarselli *et al.*, 2002). A l'inverse, une interaction directe entre les glycoprotéines d'enveloppe E1E2 et le récepteur CLDN1 dans des cellules hépatocytaires n'a jamais pu être observée. Notre analyse en cytométrie de flux de l'attachement des VHCpp aux cellules hépatocytaires en présence d'anticorps anti-CLDN1 montre que ces anticorps empêchent l'interaction des pseudo-particules avec la cellule. Récemment, Harris et al., ont montré que CD81 et CLDN1 co-localisent au niveau des membranes des cellules hépatocytaires (Harris *et al.*, 2008). Nous avons donc proposé que les anticorps anti-CLDN1 pouvaient agir de manière indirecte en perturbant l'association des protéines CLDN1 et CD81 au niveau de la membrane des cellules hépatocytaires. La méthode de FRET a été utilisée pour répondre à cette hypothèse. Ce travail a été fait en collaboration avec le laboratoire de J. Mc Keating (University of

Birmingham, UK). Le FRET est basé sur le transfert d'énergie entre un fluorophore donneur et un fluorophore accepteur. Ce transfert ne peut se faire que quand les deux molécules sont à moins de 10nm. Les expériences de FRET ont permis de montrer que l'association CLDN1-CD81 était effectivement perturbée en présence d'anticorps anti-CLDN1. Alors que l'association d'homodimères CLDN1-CLDN1 ou CD81-CD81 n'était pas affectée. Ces résultats suggèrent que l'association CLDN1-CD81 est nécessaire pour l'entrée du virus dans la cellule hôte. Par contre, il nous a été impossible de co-immunoprécipiter CD81 et CLDN1 dans les cellules hépatocytaires. Ce résultat est en faveur d'une association entre les deux protéines plutôt qu'une interaction protéine-protéine forte.

Pour le moment, l'étude par FRET d'une association entre CLDN1 et SR-BI n'est techniquement pas possible car la protéine SR-BI taggée est retenue dans le cytoplasme des cellules au lieu d'être présente à la surface membranaire.

La protéine CLDN1 faisant partie des jonctions serrées, nous avons voulu savoir si nos anticorps anti-CLDN1 perturbaient l'intégrité des jonctions serrées. Pour cela, nous avons utilisé des cellules hépatocytaires HepG2. Ces cellules sont un bon modèle pour l'étude du rôle de la polarité cellulaire dans l'entrée du VHC. En effet, en culture, elles se polarisent et forment des canalicules biliaires (Mee *et al.*, 2009). Ces cellules ont été mises en présence d'un traceur cellulaire, le CMFDA, qui une fois entré dans les cellules va être transformé en un produit fluorescent qui va se localiser spécifiquement dans les canalicules biliaires. Si les jonctions sont maintenues le traceur restera localisé au niveau des canalicules biliaires, sinon il diffusera. Les cellules traitées au CMFDA ont été mises en présence d'anticorps anti-CLDN1 ou d'IFN γ . Contrairement au traitement avec l'IFN γ , les anticorps anti-CLDN1 n'altèrent pas l'intégrité des jonctions serrées. Et de ce fait nous pouvons proposer que le mécanisme d'entrée du virus via CLDN1, ne met pas directement en jeu les jonctions serrées mais que c'est la protéine CLDN1 non associée aux jonctions serrées qui intervient lors de l'entrée du virus dans la cellule.

Une étude récente montre que l'engagement de CD81 active la voie des Rho-GTPase qui induit un remodelage du réseau d'actine initiant un mécanisme de transport de CD81 associé au virus au niveau des jonctions serrées (Brazzoli *et al.*, 2008). Il a été observé qu'en présence de E2, CD81 se relocalise au niveau des points contacts cellule-cellule (dans des cellules hépatocytaires non polarisées). Lors de nos études d'immunomarquage, nous observons que CLDN1 se localise également au niveau des points de contact entre les cellules. Ainsi, on peut imaginer que CD81 en association avec CLDN1 initie l'internalisation du virus et que la protéine de jonction OCLN impliquée plus tardivement dans le processus d'entrée du virus (Benedicto *et al.*, 2008) permette, elle, l'endocytose des particules virales.

Proposition de modèle d'entrée

A partir des données obtenues lors de nos travaux, ainsi que des données récentes de la littérature, nous pouvons à présent proposer un modèle affiné du processus d'entrée du virus dans la cellule. La particule virale, provenant de la circulation sanguine, s'attache à la surface des hépatocytes de manière non spécifique aux GAGs et aux LDL-R, puis reconnaît spécifiquement SR-BI au niveau du pôle basolatéral. SR-BI va amener cette particule virale au niveau de CD81 et la particule s'y fixe de manière spécifique. L'interaction des glycoprotéines d'enveloppe E1E2 avec le récepteur CD81 induit sa relocalisation au niveau des jonctions cellulaires (Brazzoli *et al.*, 2008) où il va rencontrer les protéines de jonction CLDN1 et OCLN. Comme nous l'avons montré l'association des co-facteurs CD81 et CLDN1 est nécessaire pour initier l'internalisation du virus (Krieger *et al.*, 2009) et est suivie d'une interaction avec OCLN. Cette étape est suivie par l'endocytose de la particule via les puits à clathrines (Blanchard *et al.*, 2006).

Facteurs d'entrée comme cible thérapeutique

Le progrès des connaissances concernant les co-facteurs d'entrée du VHC dans la cellule (Perrault and Pecheur, 2009), fait de l'étape d'entrée une cible intéressante pour le développement de nouvelles thérapeutiques antivirales.

Au cours de nos travaux, nous avons montré que les anticorps anti-CLDN1 que nous avons produit déstabilisent l'interaction E2-CD81 via CLDN1, permettant ainsi de bloquer l'entrée du virus. Ce mécanisme de neutralisation de l'entrée est indépendant du génotype puisque les pseudotypes viraux de génotype 1 à 4 sont bloqués par nos anticorps. De plus, par utilisation du CMFDA, nous montrons que nos anticorps anti-CLDN1 incubés avec des cellules HepG2 polarisées ne perturbent pas l'intégrité des jonctions serrées. L'ensemble de ces résultats fait que les anticorps anti-CLDN1 obtenus au cours de ce travail, constituent une bonne preuve de concept pour l'utilisation de ces anticorps comme un outil thérapeutique pour inhiber l'infection par le VHC. Une telle utilisation serait par exemple envisageable pour endiguer la réinfection systématique du greffon après transplantation hépatique ou comme traitement préventif des expositions accidentelles au sang contaminé (personnel hospitalier). Des études sont en cours au laboratoire pour déterminer si les anticorps anti-CLDN1 produits sont capables de bloquer la propagation des virions par la transmission de cellule à cellule ou dans le modèle murin des souris uPA/SCID. C'est dans l'optique d'utiliser de tels anticorps en thérapeutique que nous avons commencé le développement d'anticorps monoclonaux dirigés contre CLDN1.

Une thérapie basée sur l'utilisation d'anticorps dirigés contre des protéines de l'hôte, spécifiquement impliquées dans les relations virus-hôte, est d'autant plus intéressante qu'elle nous affranchit du problème de la variabilité du virus. C'est dans cet esprit que Meuleman et al., ont utilisé des anticorps anti-CD81 comme traitement prophylactique de l'infection VHC de souris uPA-SCID (Meuleman *et al.*, 2008). Cependant, dans ces expériences, l'injection d'anticorps anti-CD81 après exposition au virus n'empêche pas sa propagation (Meuleman *et al.*, 2008).

Nous sommes les premiers à avoir produit des anticorps anti-CLDN1 inhibant spécifiquement l'entrée du VHC en culture cellulaire.

C'est un outil aux applications multiples, pouvant être utilisé en routine au laboratoire pour la détection par western blot, immunofluorescence et cytométrie en flux de la protéine CLDN1. Mais ces anticorps peuvent également être utilisés pour la compréhension des mécanismes d'entrée dans la cellule. Nous avons montré que l'association de la protéine CLDN1 au récepteur CD81 est nécessaire pour l'internalisation des particules virales. Brazzoli et al., ont montré qu'en présence de la glycoprotéine d'enveloppe E2, le complexe E2-CD81 se relocalise au niveau des points de contact entre les cellules (Brazzoli *et al.*, 2008). Ce mécanisme est dépendant de la voie des Rho-GTPase et d'un réarrangement du réseau d'actine. Il serait intéressant de savoir si les anticorps anti-CLDN1, perturbant l'association CLDN1-CD81, empêchent la relocalisation de CD81 ou si cet effet est dû à une relocalisation de la protéine CLDN1.

Récemment, Cukierman et al., ont montré, en utilisant des mutants de la protéine CLDN1, que certains résidus des domaines extracellulaires de la protéine CLDN1 sont nécessaires à l'entrée du virus dans la cellule (Cukierman *et al.*, 2009). Il serait également intéressant de voir s'il existe des résidus dans les domaines transmembranaires nécessaires à l'association CLDN1-CD81. Ces mutants pourraient être testés par la méthode du FRET pour voir lesquels induisent une dissociation du complexe CLDN1-CD81.

Nous avons également produit des anticorps anti-CLDN1 reconnaissant les domaines extracellulaires de CLDN1, mais qui n'inhibent pas le mécanisme d'entrée. Nous pourrions également utiliser ces anticorps anti-CLDN1 afin d'observer par microscopie à fluorescence l'entrée du virus ou de pseudo-particules dans la cellule.

Tout au long de notre étude, nous avons utilisé des cellules non polarisées. Nous sommes actuellement en train de développer une lignée HepG2 exprimant de manière

stable CD81 et qui se polarisent en culture. Cette lignée nous permettra, dans un contexte se rapprochant de la réalité, de voir si, dans ces conditions, les anticorps anti-CLDN1 ont toujours un effet sur l'association CDLN1-CD81.

La protéine de jonction OCLN (Liu *et al.*, 2009b; Ploss *et al.*, 2009) intervient dans une étape tardive du processus d'entrée du VHC dans la cellule. De la même manière, nous pourrions produire des anticorps anti-OCLN pouvant inhiber l'entrée du virus et ainsi étudier toutes les facettes de l'entrée virale.

CONCLUSION

Au cours de mon travail de thèse, nous avons dans une première partie démontré qu'apoE est un facteur nécessaire à l'assemblage et à la production des particules infectieuses du VHC.

Dans une deuxième partie, nous avons produit des anticorps polyclonaux anti-CLDN1 reconnaissant spécifiquement les domaines extracellulaires de la protéine CLDN1 et pouvant inhiber l'entrée du VHC dans la cellule hôte. Nous avons aussi montré que l'entrée du VHC nécessite une coopération étroite entre les récepteurs cellulaires SR-BI, CD81 et CLDN1, juste avant l'endocytose du virus. Les anticorps anti-CLDN1 que nous avons produits, bloquent la co-localisation des hétérodimères CD81-CLDN1 au niveau des jonctions cellulaires mais n'ont pas d'effet délétère sur l'intégrité des jonctions cellulaires, suggérant ainsi la possible utilisation de ces anticorps à des fins thérapeutiques.

L'ensemble de ces travaux montrent que de nouvelles cibles thérapeutiques peuvent être envisagées dans la lutte contre le VHC.

La compréhension des interactions spécifiques du VHC avec sa cellule hôte, l'hépatocyte, sont cruciales pour le développement de nouveaux axes thérapeutiques. Ces thérapeutiques pourront cibler toutes les étapes du cycle viral sans tenir compte de la variabilité génomique du virus. De tels outils seraient de ce fait généralisables à l'ensemble de la problématique VHC. Bien entendu, de telles molécules ne seraient utiles que dans le cadre de traitements prophylactiques.

En plus de l'utilisation de ces molécules lors de la transplantation hépatique pour éviter ou contenir la réinfection du greffon ou dans les cas d'expositions accidentelles au virus, qui sont des cas d'infections aiguës rapidement décelées, nous pourrions également envisager leur utilisation pour freiner la progression de la maladie hépatique après le passage à la chronicité, nos anticorps ayant la capacité d'inhiber également la transmission cellule à cellule du VHC (données non publiées du laboratoire).

Ainsi la découverte de nouvelles interactions VHC-hôte est essentielle car elle ouvrira de nouvelles perspectives thérapeutiques qui, nous en sommes persuadés, permettra de proposer des options de traitements originales à un panel toujours plus large de patients infectés par ce virus.

BIBLIOGRAPHIE

2002. NIH Consensus Statement on Management of Hepatitis C: 2002. NIH Consensus State Sci Statements 19:1-46.

ABEL K, WANG Y, FRITTS L, SANCHEZ E, CHUNG E, FITZGERALD-BOCARSLY P, KRIEG AM, MILLER CJ, 2005. Deoxycytidyl-deoxyguanosine oligonucleotide classes A, B, and C induce distinct cytokine gene expression patterns in rhesus monkey peripheral blood mononuclear cells and distinct alpha interferon responses in TLR9-expressing rhesus monkey plasmacytoid dendritic cells. Clin Diagn Lab Immunol 12:606-621.

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 96:12766-12771.

ALI N, PRUIJN GJ, KENAN DJ, KEENE JD, SIDDIQUI A, 2000. Human La antigen is required for the hepatitis C virus internal ribosome entry site-mediated translation. J Biol Chem 275:27531-27540.

ALTER HJ, PURCELL RH, HOLLAND PV, POPPER H, 1978. Transmissible agent in non-A, non-B hepatitis. Lancet 1:459-463.

ALTER MJ, 2007. Epidemiology of hepatitis C virus infection. World J Gastroenterol 13:2436-2441.

ANDERSON JM, VAN ITALLIE CM, 2008. Tight junctions. Curr Biol 18:R941-R943.

ANDRE P, KOMURIAN-PRADEL F, DEFORGES S, PERRET M, BERLAND JL, SODOYER M, POL S, BRECHOT C, PARANHOS-BACCALA G, LOTTEAU V, 2002. Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles. J Virol 76:6919-6928.

ANDRE P, PERLEMUTER G, BUDKOWSKA A, BRECHOT C, LOTTEAU V, 2005. Hepatitis C virus particles and lipoprotein metabolism. Semin Liver Dis 25:93-104.

ANDREO U, MAILLARD P, KALININA O, WALIC M, MEURS E, MARTINOT M, MARCELLIN P, BUDKOWSKA A, 2007. Lipoprotein lipase mediates hepatitis C virus (HCV) cell entry and inhibits HCV infection. Cell Microbiol 9:2445-2456.

ANWAR A, ALI N, TANVEER R, SIDDIQUI A, 2000. 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 275:34231-34235.

- APPEL N, BARTENSCHLAGER R, 2006. A novel function for a micro RNA: negative regulators can do positive for the hepatitis C virus. *Hepatology* 43:612-615.
- APPEL N, HERIAN U, BARTENSCHLAGER R, 2005a. Efficient rescue of hepatitis C virus RNA replication by trans-complementation with nonstructural protein 5A. *J Virol* 79:896-909.
- APPEL N, PIETSCHMANN T, BARTENSCHLAGER R, 2005b. Mutational analysis of hepatitis C virus nonstructural protein 5A: potential role of differential phosphorylation in RNA replication and identification of a genetically flexible domain. *J Virol* 79:3187-3194.
- APPEL N, ZAYAS M, MILLER S, KRIJNSE-LOCKER J, SCHALLER T, FRIEBE P, KALLIS S, ENGEL U, BARTENSCHLAGER R, 2008. Essential role of domain III of nonstructural protein 5A for hepatitis C virus infectious particle assembly. *PLoS Pathog* 4:e1000035.
- ASSELAH T, BIECHE I, SABBAGH A, BEDOSSA P, MOREAU R, VALLA D, VIDAUD M, MARCELLIN P, 2009. Gene expression and hepatitis C virus infection. *Gut* 58:846-858.
- ASTIER-GIN T, BELLECAVE P, LITVAK S, VENTURA M, 2005. Template requirements and binding of hepatitis C virus NS5B polymerase during in vitro RNA synthesis from the 3'-end of virus minus-strand RNA. *FEBS J* 272:3872-3886.
- AVERILL L, LEE WM, KARANDIKAR NJ, 2007. Differential dysfunction in dendritic cell subsets during chronic HCV infection. *Clin Immunol* 123:40-49.
- BADER T, FAZILI J, MADHOUN M, ASTON C, HUGHES D, RIZVI S, SERES K, HASAN M, 2008. Fluvastatin inhibits hepatitis C replication in humans. *Am J Gastroenterol* 103:1383-1389.
- BAIN C, PARROCHE P, LAVERGNE JP, DUVERGER B, VIEUX C, DUBOIS V, KOMURIAN-PRADEL F, TREPO C, GEBUHRER L, PARANHOS-BACCALA G, PENIN F, INCHAUSPE G, 2004. Memory T-cell-mediated immune responses specific to an alternative core protein in hepatitis C virus infection. *J Virol* 78:10460-10469.
- BARLOWE C, 2000. Traffic COPs of the early secretory pathway. *Traffic* 1:371-377.
- BARTENSCHLAGER R, FRESE M, PIETSCHMANN T, 2004. Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence. *Adv Virus Res* 63:71-180.

- BARTH H, CERINO R, ARCURI M, HOFFMANN M, SCHURMANN P, ADAH MI, GISSLER B, ZHAO X, GHISETTI V, LAVEZZO B, BLUM HE, VON WF, VITELLI A, SCARSELLI E, BAUMERT TF, 2005. Scavenger receptor class B type I and hepatitis C virus infection of primary tupaia hepatocytes. *J Virol* 79:5774-5785.
- BARTH H, SCHAFER C, ADAH MI, ZHANG F, LINHARDT RJ, TOYODA H, KINOSHITA-TOYODA A, TOIDA T, VAN KUPPEVELT TH, DEPLA E, VON WF, BLUM HE, BAUMERT TF, 2003. Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate. *J Biol Chem* 278:41003-41012.
- BARTH H, SCHNOBER EK, ZHANG F, LINHARDT RJ, DEPLA E, BOSON B, COSSET FL, PATEL AH, BLUM HE, BAUMERT TF, 2006. Viral and cellular determinants of the hepatitis C virus envelope-heparan sulfate interaction. *J Virol* 80:10579-10590.
- BARTOSCH B, BUKH J, MEUNIER JC, GRANIER C, ENGLE RE, BLACKWELDER WC, EMERSON SU, COSSET FL, PURCELL RH, 2003a. In vitro assay for neutralizing antibody to hepatitis C virus: evidence for broadly conserved neutralization epitopes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:14199-14204.
- BARTOSCH B, DUBUISSON J, COSSET FL, 2003b. Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J Exp Med* 197:633-642.
- BARTOSCH B, VERNEY G, DREUX M, DONOT P, MORICE Y, PENIN F, PAWLITSKY JM, LAVILLETTE D, COSSET FL, 2005. An interplay between hypervariable region 1 of the hepatitis C virus E2 glycoprotein, the scavenger receptor BI, and high-density lipoprotein promotes both enhancement of infection and protection against neutralizing antibodies. *J Virol* 79:8217-8229.
- BARTOSCH B, VITELLI A, GRANIER C, GOUJON C, DUBUISSON J, PASCALE S, SCARSELLI E, CORTESE R, NICOSIA A, COSSET FL, 2003c. Cell entry of hepatitis C virus requires a set of co-receptors that include the CD81 tetraspanin and the SR-B1 scavenger receptor. *J Biol Chem* 278:41624-41630.
- BASSETT SE, BRASKY KM, LANFORD RE, 1998. Analysis of hepatitis C virus-inoculated chimpanzees reveals unexpected clinical profiles. *J Virol* 72:2589-2599.
- BAUMERT TF, ITO S, WONG DT, LIANG TJ, 1998. Hepatitis C virus structural proteins assemble into viruslike particles in insect cells. *J Virol* 72:3827-3836.

- BAUMERT TF, VERGALLA J, SATOI J, THOMSON M, LECHMANN M, HERION D, GREENBERG HB, ITO S, LIANG TJ, 1999. Hepatitis C virus-like particles synthesized in insect cells as a potential vaccine candidate. *Gastroenterology* 117:1397-1407.
- BENEDICTO I, MOLINA-JIMENEZ F, BARREIRO O, MALDONADO-RODRIGUEZ A, PRIETO J, MORENO-OTERO R, ALDABE R, LOPEZ-CABRERA M, MAJANO PL, 2008. Hepatitis C virus envelope components alter localization of hepatocyte tight junction-associated proteins and promote occludin retention in the endoplasmic reticulum. *Hepatology* 48:1044-1053.
- BENEDICTO I, MOLINA-JIMENEZ F, BARTOSCH B, COSSET FL, LAVILLETTE D, PRIETO J, MORENO-OTERO R, VALENZUELA-FERNANDEZ A, ALDABE R, LOPEZ-CABRERA M, MAJANO PL, 2009. The tight junction-associated protein occludin is required for a postbinding step in hepatitis C virus entry and infection. *J Virol* 83:8012-8020.
- BENGA WJ, KRIEGER SE, DIMITROVA M, ZEISEL MB, PARNOT M, LUPBERGER J, HILDT E, LUO G, MCLAUCHLAN J, BAUMERT TF, SCHUSTER C, 2010. Apolipoprotein E interacts with hepatitis C virus nonstructural protein 5A and determines assembly of infectious particles. *Hepatology* 51:43-53.
- BLANCHARD E, BELOUZARD S, GOUESLAIN L, WAKITA T, DUBUISSON J, WYCHOWSKI C, ROUILLE Y, 2006. Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J Virol* 80:6964-6972.
- BLASIOLE DA, DAVIS RA, ATTIE AD, 2007. The physiological and molecular regulation of lipoprotein assembly and secretion. *Mol Biosyst* 3:608-619.
- BLIGHT KJ, KOLYKHALOV AA, RICE CM, 2000. Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science* 290:1972-1974.
- BLIGHT KJ, MCKEATING JA, RICE CM, 2002. Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* 76:13001-13014.
- BODE JG, BRENNENDORFER ED, HAUSSINGER D, 2007. Subversion of innate host antiviral strategies by the hepatitis C virus. *Arch Biochem Biophys* 462:254-265.
- BODE JG, LUDWIG S, EHRHARDT C, ALBRECHT U, ERHARDT A, SCHAPER F, HEINRICH PC, HAUSSINGER D, 2003. IFN-alpha antagonistic activity of HCV core protein involves induction of suppressor of cytokine signaling-3. *FASEB J* 17:488-490.

- BOEHRINGER D, THERMANN R, OSTARECK-LEDERER A, LEWIS JD, STARK H, 2005. Structure of the hepatitis C virus IRES bound to the human 80S ribosome: remodeling of the HCV IRES. *Structure* 13:1695-1706.
- BOULANT S, DOUGLAS MW, MOODY L, BUDKOWSKA A, TARGETT-ADAMS P, MCLAUHLAN J, 2008. Hepatitis C virus core protein induces lipid droplet redistribution in a microtubule- and dynein-dependent manner 1. *Traffic* 9:1268-1282.
- BOULANT S, MONTSERRET R, HOPE RG, RATINIER M, TARGETT-ADAMS P, LAVERGNE JP, PENIN F, MCLAUHLAN J, 2006. Structural determinants that target the hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *J Biol Chem* 281:22236-22247.
- BOULANT S, TARGETT-ADAMS P, MCLAUHLAN J, 2007. Disrupting the association of hepatitis C virus core protein with lipid droplets correlates with a loss in production of infectious virus. *J Gen Virol* 88:2204-2213.
- BOWEN DG, WALKER CM, 2005. Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection. *Nature* 436:946-952.
- BRADLEY D, MCCAUSTLAND K, KRAWCZYNSKI K, SPELBRING J, HUMPHREY C, COOK EH, 1991. Hepatitis C virus: buoyant density of the factor VIII-derived isolate in sucrose. *J Med Virol* 34:206-208.
- BRADLEY DW, 2000. Studies of non-A, non-B hepatitis and characterization of the hepatitis C virus in chimpanzees. *Curr Top Microbiol Immunol* 242:1-23.
- BRASS V, BIECK E, MONTSERRET R, WOLK B, HELLINGS JA, BLUM HE, PENIN F, MORADPOUR D, 2002. An amino-terminal amphipathic alpha-helix mediates membrane association of the hepatitis C virus nonstructural protein 5A. *J Biol Chem* 277:8130-8139.
- BRAZZOLI M, BIANCHI A, FILIPPINI S, WEINER A, ZHU Q, PIZZA M, CROTTA S, 2008. CD81 is a central regulator of cellular events required for HCV infection of human hepatocytes. *J Virol* 82:8316-8329.
- BRESSANELLI S, TOMEI L, REY FA, DE FR, 2002. Structural analysis of the hepatitis C virus RNA polymerase in complex with ribonucleotides. *J Virol* 76:3482-3492.
- BRESSANELLI S, TOMEI L, ROUSSEL A, INCITTI I, VITALE RL, MATHIEU M, DE FR, REY FA, 1999. Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:13034-13039.

- CALLENS N, CICZORA Y, BARTOSCH B, VU-DAC N, COSSET FL, PAWLOTSKY JM, PENIN F, DUBUISSON J, 2005. Basic residues in hypervariable region 1 of hepatitis C virus envelope glycoprotein e2 contribute to virus entry. *J Virol* 79:15331-15341.
- CARRERE-KREMER S, MONTEPELLIER-PALA C, COCQUEREL L, WYCHOWSKI C, PENIN F, DUBUISSON J, 2002. Subcellular localization and topology of the p7 polypeptide of hepatitis C virus. *J Virol* 76:3720-3730.
- CATANESE MT, ANSUINI H, GRAZIANI R, HUBY T, MOREAU M, BALL JK, PAONESSA G, RICE CM, CORTESE R, VITELLI A, NICOSIA A, 2009. Role of SR-BI in HCV entry: kinetics and molecular determinants. *J Virol*.
- CHANG KM, REHERMANN B, MCHUTCHISON JG, PASQUINELLI C, SOUTHWOOD S, SETTE A, CHISARI FV, 1997. Immunological significance of cytotoxic T lymphocyte epitope variants in patients chronically infected by the hepatitis C virus. *J Clin Invest* 100:2376-2385.
- CHANG KS, JIANG J, CAI Z, LUO G, 2007. Human apolipoprotein e is required for infectivity and production of hepatitis C virus in cell culture. *J Virol* 81:13783-13793.
- CHARRIN S, LE NF, LABAS V, BILLARD M, LE CAER JP, EMILE JF, PETIT MA, BOUCHEIX C, RUBINSTEIN E, 2003. EWI-2 is a new component of the tetraspanin web in hepatocytes and lymphoid cells. *Biochem J* 373:409-421.
- CHARRIN S, LE NF, SILVIE O, MILHIET PE, BOUCHEIX C, RUBINSTEIN E, 2009. Lateral organization of membrane proteins: tetraspanins spin their web. *Biochem J* 420:133-154.
- CHEVALIEZ S, PAWLOTSKY JM, 2007. Hepatitis C virus: virology, diagnosis and management of antiviral therapy. *World J Gastroenterol* 13:2461-2466.
- CHIBA H, OSANAI M, MURATA M, KOJIMA T, SAWADA N, 2008. Transmembrane proteins of tight junctions. *Biochim Biophys Acta* 1778:588-600.
- CHOI J, LEE KJ, ZHENG Y, YAMAGA AK, LAI MM, OU JH, 2004. Reactive oxygen species suppress hepatitis C virus RNA replication in human hepatoma cells. *Hepatology* 39:81-89.
- CHOO QL, KUO G, WEINER AJ, OVERBY LR, BRADLEY DW, HOUGHTON M, 1989. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244:359-362.

- COCQUEREL L, OP DE BEECK A., LAMBOT M, ROUSSEL J, DELGRANGE D, PILLEZ A, WYCHOWSKI C, PENIN F, DUBUISSON J, 2002. Topological changes in the transmembrane domains of hepatitis C virus envelope glycoproteins. *EMBO J* 21:2893-2902.
- COCQUEREL L, WYCHOWSKI C, MINNER F, PENIN F, DUBUISSON J, 2000. Charged residues in the transmembrane domains of hepatitis C virus glycoproteins play a major role in the processing, subcellular localization, and assembly of these envelope proteins. *J Virol* 74:3623-3633.
- CORMIER EG, DURSO RJ, TSAMIS F, BOUSSEMART L, MANIX C, OLSON WC, GARDNER JP, DRAGIC T, 2004. L-SIGN (CD209L) and DC-SIGN (CD209) mediate transinfection of liver cells by hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:14067-14072.
- COYNE CB, BERGELSON JM, 2006. Virus-induced Abl and Fyn kinase signals permit coxsackievirus entry through epithelial tight junctions. *Cell* 124:119-131.
- CRISPE IN, 2009. The liver as a lymphoid organ. *Annu Rev Immunol* 27:147-163.
- CUKIERMAN L, MEERTENS L, BERTAUX C, KAJUMO F, DRAGIC T, 2009. Residues in a highly conserved claudin-1 motif are required for hepatitis C virus entry and mediate the formation of cell-cell contacts. *J Virol* 83:5477-5484.
- DAY CL, LAUER GM, ROBBINS GK, MCGOVERN B, WURCEL AG, GANDHI RT, CHUNG RT, WALKER BD, 2002. Broad specificity of virus-specific CD4+ T-helper-cell responses in resolved hepatitis C virus infection. *J Virol* 76:12584-12595.
- DE FR, MIGLIACCIO G, 2005. Challenges and successes in developing new therapies for hepatitis C. *Nature* 436:953-960.
- DELANG L, PAESHUYSE J, VLIEGEN I, LEYSSEN P, OBEID S, DURANTEL D, ZOULIM F, OP DE BEECK A., NEYTS J, 2009. Statins potentiate the in vitro anti-hepatitis C virus activity of selective hepatitis C virus inhibitors and delay or prevent resistance development. *Hepatology* 50:6-16.
- DENTZER TG, LORENZ IC, EVANS MJ, RICE CM, 2009. Determinants of hepatitis C virus nonstructural protein 2 protease domain required for production of infectious virus. *J Virol*.

- DER SD, ZHOU A, WILLIAMS BR, SILVERMAN RH, 1998. Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:15623-15628.
- DERGUNOV AD, VISVIKIS-SIEST S, SIEST G, 2008. Statins as effectors of key activities involved in apoE-dependent VLDL metabolism: review and hypothesis. *Vascul Pharmacol* 48:70-75.
- DOLGANIUC A, CHANG S, KODYS K, MANDREKAR P, BAKIS G, CORMIER M, SZABO G, 2006. Hepatitis C virus (HCV) core protein-induced, monocyte-mediated mechanisms of reduced IFN-alpha and plasmacytoid dendritic cell loss in chronic HCV infection. *J Immunol* 177:6758-6768.
- DREUX M, PIETSCHMANN T, GRANIER C, VOISSET C, RICARD-BLUM S, MANGEOT PE, KECK Z, FOUNG S, VU-DAC N, DUBUISSON J, BARTENSCHLAGER R, LAVILLETTE D, COSSET FL, 2006. High density lipoprotein inhibits hepatitis C virus-neutralizing antibodies by stimulating cell entry via activation of the scavenger receptor BI. *J Biol Chem* 281:18285-18295.
- DRUMMER HE, WILSON KA, POUMBOURIOS P, 2002. Identification of the hepatitis C virus E2 glycoprotein binding site on the large extracellular loop of CD81. *J Virol* 76:11143-11147.
- DUBUISSON J, DUVET S, MEUNIER JC, OP DE BEECK A., CACAN R, WYCHOWSKI C, COCQUEREL L, 2000. Glycosylation of the hepatitis C virus envelope protein E1 is dependent on the presence of a downstream sequence on the viral polyprotein. *J Biol Chem* 275:30605-30609.
- DURANTE D, ALOTTE C, ZOULIM F, 2007. Glucosidase inhibitors as antiviral agents for hepatitis B and C. *Curr Opin Investig Drugs* 8:125-129.
- EGGER D, WOLK B, GOSERT R, BIANCHI L, BLUM HE, MORADPOUR D, BIENZ K, 2002. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol* 76:5974-5984.
- ELMOWALID GA, QIAO M, JEONG SH, BORG BB, BAUMERT TF, SAPP RK, HU Z, MURTHY K, LIANG TJ, 2007. Immunization with hepatitis C virus-like particles results in control of hepatitis C virus infection in chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:8427-8432.

- EVANS MJ, RICE CM, GOFF SP, 2004. Phosphorylation of hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates its protein interactions and viral RNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:13038-13043.
- EVANS MJ, VON HT, TSCHERNE DM, SYDER AJ, PANIS M, WOLK B, HATZIIIOANNOU T, MCKEATING JA, BIENIASZ PD, RICE CM, 2007. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* 446:801-805.
- FALKOWSKA E, KAJUMO F, GARCIA E, REINUS J, DRAGIC T, 2007. Hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 glycans modulate entry, CD81 binding, and neutralization. *J Virol* 81:8072-8079.
- FARCI P, ALTER HJ, GOVINDARAJAN S, WONG DC, ENGLE R, LESNIEWSKI RR, MUSHAHWAR IK, DESAI SM, MILLER RH, OGATA N, ., 1992. Lack of protective immunity against reinfection with hepatitis C virus. *Science* 258:135-140.
- FARCI P, ALTER HJ, WONG DC, MILLER RH, GOVINDARAJAN S, ENGLE R, SHAPIRO M, PURCELL RH, 1994. Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees after antibody-mediated in vitro neutralization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:7792-7796.
- FEINSTONE SM, ALTER HJ, DIENES HP, SHIMIZU Y, POPPER H, BLACKMORE D, SLY D, LONDON WT, PURCELL RH, 1981. Non-A, non-B hepatitis in chimpanzees and marmosets. *J Infect Dis* 144:588-598.
- FEINSTONE SM, KAPIKIAN AZ, PURCELL RH, ALTER HJ, HOLLAND PV, 1975. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N Engl J Med* 292:767-770.
- FIORUCCI M, BOULANT S, FOURNILLIER A, ABRAHAM JD, LAVERGNE JP, PARANHOS-BACCALA G, INCHAUSPE G, BAIN C, 2007. Expression of the alternative reading frame protein of Hepatitis C virus induces cytokines involved in hepatic injuries. *J Gen Virol* 88:1149-1162.
- FLINT M, THOMAS JM, MAIDENS CM, SHOTTON C, LEVY S, BARCLAY WS, MCKEATING JA, 1999. Functional analysis of cell surface-expressed hepatitis C virus E2 glycoprotein. *J Virol* 73:6782-6790.
- FORNS X, THIMME R, GOVINDARAJAN S, EMERSON SU, PURCELL RH, CHISARI FV, BUKH J, 2000. Hepatitis C virus lacking the hypervariable region 1 of the second envelope protein is infectious and causes acute resolving or persistent infection in chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:13318-13323.

- FOY E, LI K, SUMPTER R, JR., LOO YM, JOHNSON CL, WANG C, FISH PM, YONEYAMA M, FUJITA T, LEMON SM, GALE M, JR., 2005. Control of antiviral defenses through hepatitis C virus disruption of retinoic acid-inducible gene-I signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:2986-2991.
- FRASER CS, DOUDNA JA, 2007. Structural and mechanistic insights into hepatitis C viral translation initiation. *Nat Rev Microbiol* 5:29-38.
- FRESE M, SCHWARZLE V, BARTH K, KRIEGER N, LOHMANN V, MIHM S, HALLER O, BARTENSCHLAGER R, 2002. Interferon-gamma inhibits replication of subgenomic and genomic hepatitis C virus RNAs. *Hepatology* 35:694-703.
- FRIEBE P, BARTENSCHLAGER R, 2009. Role of RNA structures in genome terminal sequences of the hepatitis C virus for replication and assembly. *J Virol* 83:11989-11995.
- FRIEBE P, BOUDET J, SIMORRE JP, BARTENSCHLAGER R, 2005. Kissing-loop interaction in the 3' end of the hepatitis C virus genome essential for RNA replication. *J Virol* 79:380-392.
- FRIEBE P, LOHMANN V, KRIEGER N, BARTENSCHLAGER R, 2001. Sequences in the 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication. *J Virol* 75:12047-12057.
- FUKUSHI S, OKADA M, KAGEYAMA T, HOSHINO FB, NAGAI K, KATAYAMA K, 2001. Interaction of poly(rC)-binding protein 2 with the 5'-terminal stem loop of the hepatitis C-virus genome. *Virus Res* 73:67-79.
- FURUSE M, FUJITA K, HIIRAGI T, FUJIMOTO K, TSUKITA S, 1998. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol* 141:1539-1550.
- GALE M, JR., FOY EM, 2005. Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus. *Nature* 436:939-945.
- GALE MJ, JR., KORTH MJ, KATZE MG, 1998. Repression of the PKR protein kinase by the hepatitis C virus NS5A protein: a potential mechanism of interferon resistance. *Clin Diagn Virol* 10:157-162.
- GALOSSO A, GUARISCO R, BELLIS L, PUOTI C, 2007. Extrahepatic manifestations of chronic HCV infection. *J Gastrointest Liver Dis* 16:65-73.

- 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* 78:3480-3488.
- 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* 82:2120-2129.
- GASTAMINZA P, KAPADIA SB, CHISARI FV, 2006. Differential biophysical properties of infectious intracellular and secreted hepatitis C virus particles. *J Virol* 80:11074-11081.
- GE D, FELLAY J, THOMPSON AJ, SIMON JS, SHIANNAN KV, URBAN TJ, HEINZEN EL, QIU P, BERTELSEN AH, MUIR AJ, SULKOWSKI M, MCHUTCHISON JG, GOLDSTEIN DB, 2009. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* 461:399-401.
- GHANY MG, STRADER DB, THOMAS DL, SEEFF LB, 2009. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. *Hepatology* 49:1335-1374.
- GOFFARD A, CALLENS N, BARTOSCH B, WYCHOWSKI C, COSSET FL, MONTPELLIER C, DUBUISSON J, 2005. Role of N-linked glycans in the functions of hepatitis C virus envelope glycoproteins. *J Virol* 79:8400-8409.
- GOSERT R, EGGER D, LOHMANN V, BARTENSCHLAGER R, BLUM HE, BIENZ K, MORADPOUR D, 2003. Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons. *J Virol* 77:5487-5492.
- GOTO K, WATASHI K, MURATA T, HISHIKI T, HIJIKATA M, SHIMOTOHNO K, 2006. Evaluation of the anti-hepatitis C virus effects of cyclophilin inhibitors, cyclosporin A, and NIM811. *Biochem Biophys Res Commun* 343:879-884.
- GOUTTENOIRE J, CASTET V, MONTSERRET R, ARORA N, RAUSSENS V, RUYSSCHAERT JM, DIESIS E, BLUM HE, PENIN F, MORADPOUR D, 2009a. Identification of a novel determinant for membrane association in hepatitis C virus nonstructural protein 4B. *J Virol* 83:6257-6268.
- GOUTTENOIRE J, MONTSERRET R, KENNEL A, PENIN F, MORADPOUR D, 2009b. An amphipathic alpha-helix at the C terminus of hepatitis C virus nonstructural protein 4B mediates membrane association. *J Virol* 83:11378-11384.

- GRAKOU I A, SHOUKRY NH, WOOLLARD DJ, HAN JH, HANSON HL, GHAYEB J, MURTHY KK, RICE CM, WALKER CM, 2003. HCV persistence and immune evasion in the absence of memory T cell help. *Science* 302:659-662.
- GUIDOTTI LG, CHISARI FV, 2001. Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response. *Annu Rev Immunol* 19:65-91.
- HAID S, PIETSCHMANN T, PECHEUR EI, 2009. Low pH-dependent hepatitis C virus membrane fusion depends on E2 integrity, target lipid composition, and density of virus particles. *J Biol Chem* 284:17657-17667.
- 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* 79:13473-13482.
- HARDER CJ, MENG A, RIPPSTEIN P, MCBRIDE HM, MCPHERSON R, 2007. SR-BI undergoes cholesterol-stimulated transcytosis to the bile canaliculus in polarized WIF-B cells. *J Biol Chem* 282:1445-1455.
- HARRIS HJ, FARQUHAR MJ, MEE CJ, DAVIS C, REYNOLDS GM, JENNINGS A, HU K, YUAN F, DENG H, HUBSCHER SG, HAN JH, BALFE P, MCKEATING JA, 2008. CD81 and claudin 1 coreceptor association: role in hepatitis C virus entry. *J Virol* 82:5007-5020.
- HELLE F, GOFFARD A, MOREL V, DUVERLIE G, MCKEATING J, KECK ZY, FOUNG S, PENIN F, DUBUISSON J, VOISSET C, 2007. The neutralizing activity of anti-hepatitis C virus antibodies is modulated by specific glycans on the E2 envelope protein. *J Virol* 81:8101-8111.
- HEWITT KJ, AGARWAL R, MORIN PJ, 2006. The claudin gene family: expression in normal and neoplastic tissues. *BMC Cancer* 6:186.
- HEZODE C, FORESTIER N, DUSHEIKO G, FERENCI P, POL S, GOESER T, BRONOWICKI JP, BOURLIERE M, GHARAKHANIAN S, BENGTSSON L, MCNAIR L, GEORGE S, KIEFFER T, KWONG A, KAUFFMAN RS, ALAM J, PAWLITSKY JM, ZEUZEM S, 2009. Telaprevir and peginterferon with or without ribavirin for chronic HCV infection. *N Engl J Med* 360:1839-1850.

- HIJIKATA M, SHIMIZU YK, KATO H, IWAMOTO A, SHIH JW, ALTER HJ, PURCELL RH, YOSHIKURA H, 1993. Equilibrium centrifugation studies of hepatitis C virus: evidence for circulating immune complexes. *J Virol* 67:1953-1958.
- HIROISHI K, ITO T, IMAWARI M, 2008. Immune responses in hepatitis C virus infection and mechanisms of hepatitis C virus persistence. *J Gastroenterol Hepatol* 23:1473-1482.
- HONG Z, CAMERON CE, WALKER MP, CASTRO C, YAO N, LAU JY, ZHONG W, 2001. A novel mechanism to ensure terminal initiation by hepatitis C virus NS5B polymerase. *Virology* 285:6-11.
- HORTON JD, GOLDSTEIN JL, BROWN MS, 2002. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest* 109:1125-1131.
- 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* 100:7271-7276.
- HUANG H, SUN F, OWEN DM, LI W, CHEN Y, GALE M, JR., YE J, 2007a. Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:5848-5853.
- HUANG L, HWANG J, SHARMA SD, HARGITTAI MR, CHEN Y, ARNOLD JJ, RANEY KD, CAMERON CE, 2005. Hepatitis C virus nonstructural protein 5A (NS5A) is an RNA-binding protein. *J Biol Chem* 280:36417-36428.
- HUANG Y, STASCHKE K, DE FR, TAN SL, 2007b. Phosphorylation of hepatitis C virus NS5A nonstructural protein: a new paradigm for phosphorylation-dependent viral RNA replication? *Virology* 364:1-9.
- HUGLE T, FEHRMANN F, BIECK E, KOHARA M, KRAUSSLICH HG, RICE CM, BLUM HE, MORADPOUR D, 2001. The hepatitis C virus nonstructural protein 4B is an integral endoplasmic reticulum membrane protein. *Virology* 284:70-81.
- ICARD V, DIAZ O, SCHOLTES C, PERRIN-COCON L, RAMIERE C, BARTENSCHLAGER R, PENIN F, LOTTEAU V, ANDRE P, 2009. Secretion of hepatitis C virus envelope glycoproteins depends on assembly of apolipoprotein B positive lipoproteins. *PLoS ONE* 4:e4233.

- IKEDA M, ABE K, YAMADA M, DANSAKO H, NAKA K, KATO N, 2006. Different anti-HCV profiles of statins and their potential for combination therapy with interferon. *Hepatology* 44:117-125.
- ISHII S, KOZIEL MJ, 2008. Immune responses during acute and chronic infection with hepatitis C virus. *Clin Immunol* 128:133-147.
- IVASHKINA N, WOLK B, LOHMANN V, BARTENSCHLAGER R, BLUM HE, PENIN F, MORADPOUR D, 2002. The hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase membrane insertion sequence is a transmembrane segment. *J Virol* 76:13088-13093.
- JENNINGS TA, CHEN Y, SIKORA D, HARRISON MK, SIKORA B, HUANG L, JANKOWSKY E, FAIRMAN ME, CAMERON CE, RANEY KD, 2008. RNA unwinding activity of the hepatitis C virus NS3 helicase is modulated by the NS5B polymerase. *Biochemistry* 47:1126-1135.
- JI H, FRASER CS, YU Y, LEARY J, DOUDNA JA, 2004. Coordinated assembly of human translation initiation complexes by the hepatitis C virus internal ribosome entry site RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:16990-16995.
- JIANG J, LUO G, 2009. Apolipoprotein E but Not B Is Required for the Formation of Infectious Hepatitis C Virus Particles. *J Virol* 83:12680-12691.
- JIRASKO V, MONTSERRET R, APPEL N, JANVIER A, EUSTACHI L, BROHM C, STEINMANN E, PIETSCHMANN T, PENIN F, BARTENSCHLAGER R, 2008. Structural and functional characterization of nonstructural protein 2 for its role in hepatitis C virus assembly. *J Biol Chem* 283:28546-28562.
- 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* 81:8374-8383.
- JOPLING CL, YI M, LANCASTER AM, LEMON SM, SARNOW P, 2005. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science* 309:1577-1581.
- KAITO M, WATANABE S, TSUKIYAMA-KOHARA K, YAMAGUCHI K, KOBAYASHI Y, KONISHI M, YOKOI M, ISHIDA S, SUZUKI S, KOHARA M, 1994. Hepatitis C virus particle detected by immunoelectron microscopic study. *J Gen Virol* 75 (Pt 7):1755-1760.
- KANTO T, INOUE M, MIYATAKE H, SATO A, SAKAKIBARA M, YAKUSHIJIN T, OKI C, ITOSE I, HIRAMATSU N, TAKEHARA T, KASAHARA A, HAYASHI N, 2004. Reduced numbers

and impaired ability of myeloid and plasmacytoid dendritic cells to polarize T helper cells in chronic hepatitis C virus infection. *J Infect Dis* 190:1919-1926.

KAPADIA SB, BARTH H, BAUMERT T, MCKEATING JA, CHISARI FV, 2007. Initiation of hepatitis C virus infection is dependent on cholesterol and cooperativity between CD81 and scavenger receptor B type I. *J Virol* 81:374-383.

KAPADIA SB, CHISARI FV, 2005. Hepatitis C virus RNA replication is regulated by host geranylgeranylation and fatty acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:2561-2566.

KAPLAN DE, SUGIMOTO K, NEWTON K, VALIGA ME, IKEDA F, AYTAMAN A, NUNES FA, LUCEY MR, VANCE BA, VONDERHEIDE RH, REDDY KR, MCKEATING JA, CHANG KM, 2007. Discordant role of CD4 T-cell response relative to neutralizing antibody and CD8 T-cell responses in acute hepatitis C. *Gastroenterology* 132:654-666.

KARAYIANNIS P, SCHEUER PJ, BAMBER M, COHN D, HURN BA, THOMAS HC, 1983. Experimental infection of Tamarins with human non-A, non-B hepatitis virus. *J Med Virol* 11:251-256.

KATO T, DATE T, MIYAMOTO M, FURUSAKA A, TOKUSHIGE K, MIZOKAMI M, WAKITA T, 2003. Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. *Gastroenterology* 125:1808-1817.

KATO T, FURUSAKA A, MIYAMOTO M, DATE T, YASUI K, HIRAMOTO J, NAGAYAMA K, TANAKA T, WAKITA T, 2001. Sequence analysis of hepatitis C virus isolated from a fulminant hepatitis patient. *J Med Virol* 64:334-339.

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:e1000546.

KITTESEN DJ, CHIANESE-BULLOCK KA, YAO ZQ, BRACIALE TJ, HAHN YS, 2000. Interaction between complement receptor gC1qR and hepatitis C virus core protein inhibits T-lymphocyte proliferation. *J Clin Invest* 106:1239-1249.

KLADE CS, WEDEMEYER H, BERG T, HINRICHSSEN H, CHOLEWINSKA G, ZEUZEM S, BLUM H, BUSCHLE M, JELOVCAN S, BUERGER V, TAUBER E, FRISCH J, MANN S, 2008. Therapeutic vaccination of chronic hepatitis C nonresponder patients with the peptide vaccine IC41. *Gastroenterology* 134:1385-1395.

- KOLYKHALOV AA, FEINSTONE SM, RICE CM, 1996. Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *J Virol* 70:3363-3371.
- KOMURIAN-PRADEL F, RAJOHARISON A, BERLAND JL, KHOURI V, PERRET M, VAN RM, POL S, NEGRO F, PARANHOS-BACCALA G, 2004. Antigenic relevance of F protein in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 40:900-909.
- 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* 80:5308-5320.
- KRIEGER SE, ZEISEL MB, DAVIS C, THUMANN C, HARRIS HJ, SCHNOBER EK, MEE C, SOULIER E, ROYER C, LAMBOTIN M, GRUNERT F, DAO T, V, DREUX M, COSSET FL, MCKEATING JA, SCHUSTER C, BAUMERT TF, 2009. Inhibition of hepatitis C virus infection by anti-claudin-1 antibodies is mediated by neutralization of E2-CD81-Claudin-1 associations. *Hepatology*.
- KUNTZEN T, TIMM J, BERICAL A, LENNON N, BERLIN AM, YOUNG SK, LEE B, HECKERMAN D, CARLSON J, REYOR LL, KLEYMAN M, MCMAHON CM, BIRCH C, SCHULZE ZUR WJ, LEDLIE T, KOEHRSEN M, KODIRA C, ROBERTS AD, LAUER GM, ROSEN HR, BIHL F, CERNY A, SPENGLER U, LIU Z, KIM AY, XING Y, SCHNEIDEWIND A, MADEY MA, FLECKENSTEIN JF, PARK VM, GALAGAN JE, NUSBAUM C, WALKER BD, LAKE-BAKAAR GV, DAAR ES, JACOBSON IM, GOMPERS ED, EDLIN BR, DONFIELD SM, CHUNG RT, TALAL AH, MARION T, BIRREN BW, HENN MR, ALLEN TM, 2008. Naturally occurring dominant resistance mutations to hepatitis C virus protease and polymerase inhibitors in treatment-naive patients. *Hepatology* 48:1769-1778.
- LAI WK, SUN PJ, ZHANG J, JENNINGS A, LALOR PF, HUBSCHER S, MCKEATING JA, ADAMS DH, 2006. Expression of DC-SIGN and DC-SIGNR on human sinusoidal endothelium: a role for capturing hepatitis C virus particles. *Am J Pathol* 169:200-208.
- LAL-NAG M, MORIN PJ, 2009. The claudins. *Genome Biol* 10:235.
- LAN KH, LAN KL, LEE WP, SHEU ML, CHEN MY, LEE YL, YEN SH, CHANG FY, LEE SD, 2007. HCV NS5A inhibits interferon-alpha signaling through suppression of STAT1 phosphorylation in hepatocyte-derived cell lines. *J Hepatol* 46:759-767.
- LAVANCHY D, 2009. The global burden of hepatitis C. *Liver Int* 29 Suppl 1:74-81.

- LAVIE M, GOFFARD A, DUBUISSON J, 2007. Assembly of a functional HCV glycoprotein heterodimer. *Curr Issues Mol Biol* 9:71-86.
- LAVILLETTE D, PECHEUR EI, DONOT P, FRESQUET J, MOLLE J, CORBAU R, DREUX M, PENIN F, COSSET FL, 2007. Characterization of fusion determinants points to the involvement of three discrete regions of both E1 and E2 glycoproteins in the membrane fusion process of hepatitis C virus. *J Virol* 81:8752-8765.
- LEE J, WU CC, LEE KJ, CHUANG TH, KATAKURA K, LIU YT, CHAN M, TAWATAO R, CHUNG M, SHEN C, COTTAM HB, LAI MM, RAZ E, CARSON DA, 2006. Activation of anti-hepatitis C virus responses via Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:1828-1833.
- LEVY S, TODD SC, MAECKER HT, 1998. CD81 (TAPA-1): a molecule involved in signal transduction and cell adhesion in the immune system. *Annu Rev Immunol* 16:89-109.
- LI D, TAKYAR ST, LOTT WB, GOWANS EJ, 2003. Amino acids 1-20 of the hepatitis C virus (HCV) core protein specifically inhibit HCV IRES-dependent translation in HepG2 cells, and inhibit both HCV. *J Gen Virol* 84:815-825.
- 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.
- LINDENBACH BD, MEULEMAN P, PLOSS A, VANWOLLEGHEM T, SYDER AJ, MCKEATING JA, LANFORD RE, FEINSTONE SM, MAJOR ME, LEROUX-ROELS G, RICE CM, 2006. Cell culture-grown hepatitis C virus is infectious in vivo and can be recultured in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:3805-3809.
- LIU B, WOLTMAN AM, JANSSEN HL, BOONSTRA A, 2009a. Modulation of dendritic cell function by persistent viruses. *J Leukoc Biol* 85:205-214.
- LIU S, YANG W, SHEN L, TURNER JR, COYNE CB, WANG T, 2009b. Tight junction proteins claudin-1 and occludin control hepatitis C virus entry and are downregulated during infection to prevent superinfection. *J Virol* 83:2011-2014.
- LOHMANN V, KORNER F, DOBIERZEWSKA A, BARTENSCHLAGER R, 2001. Mutations in hepatitis C virus RNAs conferring cell culture adaptation. *J Virol* 75:1437-1449.

- 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* 285:110-113.
- LORENZ IC, MARCOTRIGIANO J, DENTZER TG, RICE CM, 2006. Structure of the catalytic domain of the hepatitis C virus NS2-3 protease. *Nature* 442:831-835.
- LUIK P, CHEW C, AITTONIEMI J, CHANG J, WENTWORTH P, JR., DWEK RA, BIGGIN PC, VENIEN-BRYAN C, ZITZMANN N, 2009. The 3-dimensional structure of a hepatitis C virus p7 ion channel by electron microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:12712-12716.
- LUNDIN M, LINDSTROM H, GRONWALL C, PERSSON MA, 2006. Dual topology of the processed hepatitis C virus protein NS4B is influenced by the NS5A protein. *J Gen Virol* 87:3263-3272.
- MA Y, YATES J, LIANG Y, LEMON SM, YI M, 2008. NS3 helicase domains involved in infectious intracellular hepatitis C virus particle assembly. *J Virol* 82:7624-7639.
- MACDONALD A, HARRIS M, 2004. Hepatitis C virus NS5A: tales of a promiscuous protein. *J Gen Virol* 85:2485-2502.
- MAHLEY RW, RALL SC, JR., 2000. Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 1:507-537.
- MAILLARD P, HUBY T, ANDREO U, MOREAU M, CHAPMAN J, BUDKOWSKA A, 2006. The interaction of natural hepatitis C virus with human scavenger receptor SR-BI/Cla1 is mediated by ApoB-containing lipoproteins. *FASEB J* 20:735-737.
- MARCELLO T, GRAKOU I, BARBA-SPAETH G, MACHLIN ES, KOTENKO SV, MACDONALD MR, RICE CM, 2006. Interferons alpha and lambda inhibit hepatitis C virus replication with distinct signal transduction and gene regulation kinetics. *Gastroenterology* 131:1887-1898.
- MARTELL M, ESTEBAN JI, QUER J, GENESCA J, WEINER A, ESTEBAN R, GUARDIA J, GOMEZ J, 1992. Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *J Virol* 66:3225-3229.
- MCHUTCHISON JG, EVERSON GT, GORDON SC, JACOBSON IM, SULKOWSKI M, KAUFFMAN R, MCNAIR L, ALAM J, MUIR AJ, 2009. Telaprevir with peginterferon and ribavirin for chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med* 360:1827-1838.

- MCLAUCHLAN J, LEMBERG MK, HOPE G, MARTOGLIO B, 2002. Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *EMBO J* 21:3980-3988.
- MEE CJ, HARRIS HJ, FARQUHAR MJ, WILSON G, REYNOLDS G, DAVIS C, VAN IJZENDOORN SC, BALFE P, MCKEATING JA, 2009. Polarization restricts hepatitis C virus entry into HepG2 hepatoma cells. *J Virol* 83:6211-6221.
- MEERTENS L, BERTAUX C, CUKIERMAN L, CORMIER E, LAVILLETTE D, COSSET FL, DRAGIC T, 2008. The tight junction proteins claudin-1, -6, and -9 are entry cofactors for hepatitis C virus. *J Virol* 82:3555-3560.
- 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* 80:11571-11578.
- MEULEMAN P, HESSELGESSER J, PAULSON M, VANWOLLEGHEM T, DESOMBERE I, REISER H, LEROUX-ROELS G, 2008. Anti-CD81 antibodies can prevent a hepatitis C virus infection in vivo. *Hepatology* 48:1761-1768.
- MEULEMAN P, LIBBRECHT L, DE VR, DE HB, GEVAERT K, VANDEKERCKHOVE J, ROSKAMS T, LEROUX-ROELS G, 2005. Morphological and biochemical characterization of a human liver in a uPA-SCID mouse chimera. *Hepatology* 41:847-856.
- MICHALAK JP, WYCHOWSKI C, CHOUKHI A, MEUNIER JC, UNG S, RICE CM, DUBUISSON J, 1997. Characterization of truncated forms of hepatitis C virus glycoproteins. *J Gen Virol* 78 (Pt 9):2299-2306.
- MILLER RH, PURCELL RH, 1990. Hepatitis C virus shares amino acid sequence similarity with pestiviruses and flaviviruses as well as members of two plant virus supergroups. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:2057-2061.
- 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.
- 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* 278:50301-50308.

- MOLINA S, CASTET V, FOURNIER-WIRTH C, PICHARD-GARCIA L, AVNER R, HARATS D, ROITELMAN J, BARBARAS R, GRABER P, GHERSA P, SMOLARSKY M, FUNARO A, MALAVASI F, LARREY D, COSTE J, FABRE JM, SA-CUNHA A, MAUREL P, 2007. The low-density lipoprotein receptor plays a role in the infection of primary human hepatocytes by hepatitis C virus. *J Hepatol* 46:411-419.
- MORADPOUR D, BRASS V, BIECK E, FRIEBE P, GOSERT R, BLUM HE, BARTENSCHLAGER R, PENIN F, LOHMANN V, 2004. Membrane association of the RNA-dependent RNA polymerase is essential for hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* 78:13278-13284.
- MORIISHI K, MATSUURA Y, 2007. Host factors involved in the replication of hepatitis C virus. *Rev Med Virol* 17:343-354.
- MOSKOPHIDIS D, LECHNER F, PIRCHER H, ZINKERNAGEL RM, 1993. Virus persistence in acutely infected immunocompetent mice by exhaustion of antiviral cytotoxic effector T cells. *Nature* 362:758-761.
- MURATA K, LECHMANN M, QIAO M, GUNJI T, ALTER HJ, LIANG TJ, 2003. Immunization with hepatitis C virus-like particles protects mice from recombinant hepatitis C virus-vaccinia infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:6753-6758.
- MURPHY S, MARTIN S, PARTON RG, 2009. Lipid droplet-organelle interactions; sharing the fats. *Biochim Biophys Acta* 1791:441-447.
- NATTERMANN J, ZIMMERMANN H, IWAN A, VON LILIENFELD-TOAL M, LEIFELD L, NISCHALKE HD, LANGHANS B, SAUERBRUCH T, SPENGLER U, 2006. Hepatitis C virus E2 and CD81 interaction may be associated with altered trafficking of dendritic cells in chronic hepatitis C. *Hepatology* 44:945-954.
- NAVAS MC, FUCHS A, SCHVOERER E, BOHBOT A, AUBERTIN AM, STOLL-KELLER F, 2002. Dendritic cell susceptibility to hepatitis C virus genotype 1 infection. *J Med Virol* 67:152-161.
- NEGRO F, ALAEI M, 2009. Hepatitis C virus and type 2 diabetes. *World J Gastroenterol* 15:1537-1547.
- NEGRO F, SANYAL AJ, 2009. Hepatitis C virus, steatosis and lipid abnormalities: clinical and pathogenic data. *Liver Int* 29 Suppl 2:26-37.

- NELSON HB, TANG H, 2006. Effect of cell growth on hepatitis C virus (HCV) replication and a mechanism of cell confluence-based inhibition of HCV RNA and protein expression. *J Virol* 80:1181-1190.
- NETSKI DM, MOSBRUGER T, DEPLA E, MAERTENS G, RAY SC, HAMILTON RG, ROUNDTREE S, THOMAS DL, MCKEATING J, COX A, 2005. Humoral immune response in acute hepatitis C virus infection. *Clin Infect Dis* 41:667-675.
- NEUMANN-HAEFELIN C, BLUM HE, CHISARI FV, THIMME R, 2005. T cell response in hepatitis C virus infection. *J Clin Virol* 32:75-85.
- NIELSEN SU, BASSENDINE MF, BURT AD, MARTIN C, PUMEECHOCKCHAI W, TOMS GL, 2006. Association between hepatitis C virus and very-low-density lipoprotein (VLDL)/LDL analyzed in iodixanol density gradients. *J Virol* 80:2418-2428.
- OKUDA M, HINO K, KORENAGA M, YAMAGUCHI Y, KATOH Y, OKITA K, 1999. Differences in hypervariable region 1 quasispecies of hepatitis C virus in human serum, peripheral blood mononuclear cells, and liver. *Hepatology* 29:217-222.
- OKUDA M, LI K, BEARD MR, SHOWALTER LA, SCHOLLE F, LEMON SM, WEINMAN SA, 2002. Mitochondrial injury, oxidative stress, and antioxidant gene expression are induced by hepatitis C virus core protein. *Gastroenterology* 122:366-375.
- OLOFSSON SO, BOSTROM P, ANDERSSON L, RUTBERG M, LEVIN M, PERMAN J, BOREN J, 2008. Triglyceride containing lipid droplets and lipid droplet-associated proteins. *Curr Opin Lipidol* 19:441-447.
- OLOFSSON SO, BOSTROM P, ANDERSSON L, RUTBERG M, PERMAN J, BOREN J, 2009. Lipid droplets as dynamic organelles connecting storage and efflux of lipids. *Biochim Biophys Acta* 1791:448-458.
- OP DE BEECK A., COCQUEREL L, DUBUISSON J, 2001. Biogenesis of hepatitis C virus envelope glycoproteins. *J Gen Virol* 82:2589-2595.
- OP DE BEECK A., VOISSET C, BARTOSCH B, CICZORA Y, COCQUEREL L, KECK Z, FOUNG S, COSSET FL, DUBUISSON J, 2004. Characterization of functional hepatitis C virus envelope glycoproteins. *J Virol* 78:2994-3002.
- ORLAND JR, WRIGHT TL, COOPER S, 2001. Acute hepatitis C. *Hepatology* 33:321-327.

- OWEN DM, HUANG H, YE J, GALE M, JR., 2009. Apolipoprotein E on hepatitis C virion facilitates infection through interaction with low-density lipoprotein receptor. *Virology* 394:99-108.
- OWSIANKA AM, TIMMS JM, TARR AW, BROWN RJ, HICKLING TP, SZWEJK A, BIENKOWSKA-SZEWCZYK K, THOMSON BJ, PATEL AH, BALL JK, 2006. Identification of conserved residues in the E2 envelope glycoprotein of the hepatitis C virus that are critical for CD81 binding. *J Virol* 80:8695-8704.
- PAESHUYSE J, KAUL A, DE CE, ROSENWIRTH B, DUMONT JM, SCALFARO P, BARTENSCHLAGER R, NEYTS J, 2006. The non-immunosuppressive cyclosporin DEBIO-025 is a potent inhibitor of hepatitis C virus replication in vitro. *Hepatology* 43:761-770.
- PENIN F, BRASS V, APPEL N, RAMBOARINA S, MONTSERRET R, FICHEUX D, BLUM HE, BARTENSCHLAGER R, MORADPOUR D, 2004. Structure and function of the membrane anchor domain of hepatitis C virus nonstructural protein 5A. *J Biol Chem* 279:40835-40843.
- PENIN F, COMBET C, GERMANIDIS G, FRAINAIS PO, DELEAGE G, PAWLOTSKY JM, 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* 75:5703-5710.
- PEREIRA AA, JACOBSON IM, 2009. New and experimental therapies for HCV. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 6:403-411.
- PERLEMUTER G, SABILE A, LETTERON P, VONA G, TOPILCO A, CHRETIEN Y, KOIKE K, PESSAYRE D, CHAPMAN J, BARBA G, BRECHOT C, 2002. 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* 16:185-194.
- PERRAULT M, PECHEUR EI, 2009. The hepatitis C virus and its hepatic environment: a toxic but finely tuned partnership. *Biochem J* 423:303-314.
- 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* 103:7408-7413.

- 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* 76:4008-4021.
- PIETSCHMANN T, LOHMANN V, RUTTER G, KURPANER K, BARTENSCHLAGER R, 2001. Characterization of cell lines carrying self-replicating hepatitis C virus RNAs. *J Virol* 75:1252-1264.
- PILERI P, UEMATSU Y, CAMPAGNOLI S, GALLI G, FALUGI F, PETRACCA R, WEINER AJ, HOUGHTON M, ROSA D, GRANDI G, ABRIGNANI S, 1998. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 282:938-941.
- PLOSS A, EVANS MJ, GAYSINSKAYA VA, PANIS M, YOU H, DE JONG YP, RICE CM, 2009. Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature* 457:882-886.
- POCH O, SAUVAGET I, DELARUE M, TORDO N, 1989. Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *EMBO J* 8:3867-3874.
- POPESCU CI, DUBUISSON J, 2010. Role of lipid metabolism in hepatitis C virus assembly and entry. *Biol Cell* 102:63-74.
- PUDI R, SRINIVASAN P, DAS S, 2004. La protein binding at the GCAC site near the initiator AUG facilitates the ribosomal assembly on the hepatitis C virus RNA to influence internal ribosome entry site-mediated translation. *J Biol Chem* 279:29879-29888.
- QIAO M, MURATA K, DAVIS AR, JEONG SH, LIANG TJ, 2003. Hepatitis C virus-like particles combined with novel adjuvant systems enhance virus-specific immune responses. *Hepatology* 37:52-59.
- QUINKERT D, BARTENSCHLAGER R, LOHMANN V, 2005. Quantitative analysis of the hepatitis C virus replication complex. *J Virol* 79:13594-13605.
- 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* 104:12884-12889.

- RAY RB, LAGGING LM, MEYER K, RAY R, 1996. Hepatitis C virus core protein cooperates with ras and transforms primary rat embryo fibroblasts to tumorigenic phenotype. *J Virol* 70:4438-4443.
- REESINK HW, ZEUZEM S, WEEGINK CJ, FORESTIER N, VAN VA, VAN DE WETERING DE ROOIJ, MCNAIR L, PURDY S, KAUFFMAN R, ALAM J, JANSEN PL, 2006. Rapid decline of viral RNA in hepatitis C patients treated with VX-950: a phase Ib, placebo-controlled, randomized study. *Gastroenterology* 131:997-1002.
- REYNOLDS GM, HARRIS HJ, JENNINGS A, HU K, GROVE J, LALOR PF, ADAMS DH, BALFE P, HUBSCHER SG, MCKEATING JA, 2008. Hepatitis C virus receptor expression in normal and diseased liver tissue. *Hepatology* 47:418-427.
- ROBEK MD, BOYD BS, CHISARI FV, 2005. Lambda interferon inhibits hepatitis B and C virus replication. *J Virol* 79:3851-3854.
- ROBERTSON B, MYERS G, HOWARD C, BRETTIN T, BUKH J, GASCHEN B, GOJOBORI T, MAERTENS G, MIZOKAMI M, NAINAN O, NETESOV S, NISHIOKA K, SHIN I T, SIMMONDS P, SMITH D, STUYVER L, WEINER A, 1998. Classification, nomenclature, and database development for hepatitis C virus (HCV) and related viruses: proposals for standardization. International Committee on Virus Taxonomy. *Arch Virol* 143:2493-2503.
- ROCCASECCA R, ANSUINI H, VITELLI A, MEOLA A, SCARSELLI E, ACALI S, PEZZANERA M, ERCOLE BB, MCKEATING J, YAGNIK A, LAHM A, TRAMONTANO A, CORTESE R, NICOSIA A, 2003. Binding of the hepatitis C virus E2 glycoprotein to CD81 is strain specific and is modulated by a complex interplay between hypervariable regions 1 and 2. *J Virol* 77:1856-1867.
- ROCHA-PERUGINI V, LAVIE M, DELGRANGE D, CANTON J, PILLEZ A, POTEL J, LECOEUR C, RUBINSTEIN E, DUBUISSON J, WYCHOWSKI C, COCQUEREL L, 2009. The association of CD81 with tetraspanin-enriched microdomains is not essential for Hepatitis C virus entry. *BMC Microbiol* 9:111.
- ROCHA-PERUGINI V, MONTPELLIER C, DELGRANGE D, WYCHOWSKI C, HELLE F, PILLEZ A, DROBECQ H, LE NF, CHARRIN S, LEVY S, RUBINSTEIN E, DUBUISSON J, COCQUEREL L, 2008. The CD81 partner EWI-2wint inhibits hepatitis C virus entry. *PLoS ONE* 3:e1866.
- ROINGEARD P, HOURIOUX C, 2008. Hepatitis C virus core protein, lipid droplets and steatosis. *J Viral Hepat* 15:157-164.

- ROOHVAND F, MAILLARD P, LAVERGNE JP, BOULANT S, WALIC M, ANDREO U, GOUESLAIN L, HELLE F, MALLETT 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.
- ROSA D, SALETTI G, DE GE, ZORAT F, COMAR C, D'ORO U, NUTI S, HOUGHTON M, BARNABA V, POZZATO G, ABRIGNANI S, 2005. Activation of naive B lymphocytes via CD81, a pathogenetic mechanism for hepatitis C virus-associated B lymphocyte disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:18544-18549.
- ROY K, HAY G, ANDRAGETTI R, TAYLOR A, GOLDBERG D, WIESSING L, 2002. Monitoring hepatitis C virus infection among injecting drug users in the European Union: a review of the literature. *Epidemiol Infect* 129:577-585.
- RUBBIA-BRANDT L, QUADRI R, ABID K, GIOSTRA E, MALE PJ, MENTHA G, SPAHR L, ZARSKI JP, BORISCH B, HADENGUE A, NEGRO F, 2000. Hepatocyte steatosis is a cytopathic effect of hepatitis C virus genotype 3. *J Hepatol* 33:106-115.
- SAINZ B, JR., CHISARI FV, 2006. Production of infectious hepatitis C virus by well-differentiated, growth-arrested human hepatoma-derived cells. *J Virol* 80:10253-10257.
- SAKAI A, CLAIRE MS, FAULK K, GOVINDARAJAN S, EMERSON SU, PURCELL RH, BUKH J, 2003. The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:11646-11651.
- SARASIN-FILIPOWICZ M, KROL J, MARKIEWICZ I, HEIM MH, FILIPOWICZ W, 2009. Decreased levels of microRNA miR-122 in individuals with hepatitis C responding poorly to interferon therapy. *Nat Med* 15:31-33.
- SARRAZIN C, KIEFFER TL, BARTELS D, HANZELKA B, MUH U, WELKER M, WINCHERINGER D, ZHOU Y, CHU HM, LIN C, WEEGINK C, REESINK H, ZEUZEM S, KWONG AD, 2007. Dynamic hepatitis C virus genotypic and phenotypic changes in patients treated with the protease inhibitor telaprevir. *Gastroenterology* 132:1767-1777.
- SARRAZIN C, ZEUZEM S, 2010. Resistance to Direct Antiviral Agents in Patients With Hepatitis C Virus Infection. *Gastroenterology* 138:447-462.

- SCARSELLI E, ANSUINI H, CERINO R, ROCCASECCA RM, ACALI S, FILOCAMO G, TRABONI C, NICOSIA A, CORTESE R, VITELLI A, 2002. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J* 21:5017-5025.
- SCHWARZ AK, GROVE J, HU K, MEE CJ, BALFE P, MCKEATING JA, 2009. Hepatoma cell density promotes claudin-1 and scavenger receptor BI expression and hepatitis C virus internalization. *J Virol* 83:12407-12414.
- SEREBROV V, PYLE AM, 2004. Periodic cycles of RNA unwinding and pausing by hepatitis C virus NS3 helicase. *Nature* 430:476-480.
- SHACKEL NA, BOWEN DG, MCCAUGHAN GW, 2010. Snipping away at hepatitis C. *Hepatology* 51:703-705.
- SHAVINSKAYA A, BOULANT S, PENIN F, MCLAUCHLAN J, BARTENSCHLAGER R, 2007. The lipid droplet binding domain of hepatitis C virus core protein is a major determinant for efficient virus assembly. *J Biol Chem* 282:37158-37169.
- SHELNESS GS, SELLERS JA, 2001. Very-low-density lipoprotein assembly and secretion. *Curr Opin Lipidol* 12:151-157.
- SHEN L, WEBER CR, TURNER JR, 2008. The tight junction protein complex undergoes rapid and continuous molecular remodeling at steady state. *J Cell Biol* 181:683-695.
- SHEPARD CW, FINELLI L, ALTER MJ, 2005. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis* 5:558-567.
- SHIMOIKE T, KOYAMA C, MURAKAMI K, SUZUKI R, MATSUURA Y, MIYAMURA T, SUZUKI T, 2006. Down-regulation of the internal ribosome entry site (IRES)-mediated translation of the hepatitis C virus: critical role of binding of the stem-loop IIIId domain of IRES and the viral core protein. *Virology* 345:434-445.
- SHIN EC, PROTZER U, UNTERGASSER A, FEINSTONE SM, RICE CM, HASSELSCHWERT D, REHERMANN B, 2005. Liver-directed gamma interferon gene delivery in chronic hepatitis C. *J Virol* 79:13412-13420.
- SHOUKRY NH, GRAKOUI A, HOUGHTON M, CHIEN DY, GHAYEB J, REIMANN KA, WALKER CM, 2003. Memory CD8+ T cells are required for protection from persistent hepatitis C virus infection. *J Exp Med* 197:1645-1655.

- SIAVOSHIAN S, ABRAHAM JD, THUMANN C, KIENY MP, SCHUSTER C, 2005. Hepatitis C virus core, NS3, NS5A, NS5B proteins induce apoptosis in mature dendritic cells. *J Med Virol* 75:402-411.
- SIDDIQI SA, 2008. VLDL exits from the endoplasmic reticulum in a specialized vesicle, the VLDL transport vesicle, in rat primary hepatocytes. *Biochem J* 413:333-342.
- SIMMONDS P, 2004. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus--15 years on. *J Gen Virol* 85:3173-3188.
- SINGH R, KAUL R, KAUL A, KHAN K, 2007. A comparative review of HLA associations with hepatitis B and C viral infections across global populations. *World J Gastroenterol* 13:1770-1787.
- SOLLNER TH, 2004. Intracellular and viral membrane fusion: a uniting mechanism. *Curr Opin Cell Biol* 16:429-435.
- STEINMANN D, BARTH H, GISSLER B, SCHURMANN P, ADAH MI, GERLACH JT, PAPE GR, DEPLA E, JACOBS D, MAERTENS G, PATEL AH, INCHAUSPE G, LIANG TJ, BLUM HE, BAUMERT TF, 2004. Inhibition of hepatitis C virus-like particle binding to target cells by antiviral antibodies in acute and chronic hepatitis C. *J Virol* 78:9030-9040.
- STEINMANN E, PENIN F, KALLIS S, PATEL AH, BARTENSCHLAGER R, PIETSCHMANN T, 2007. Hepatitis C virus p7 protein is crucial for assembly and release of infectious virions. *PLoS Pathog* 3:e103.
- STUYVER LJ, MCBRAYER TR, THARNISH PM, HASSAN AE, CHU CK, PANKIEWICZ KW, WATANABE KA, SCHINAZI RF, OTTO MJ, 2003. Dynamics of subgenomic hepatitis C virus replicon RNA levels in Huh-7 cells after exposure to nucleoside antimetabolites. *J Virol* 77:10689-10694.
- SU AI, PEZACKI JP, WODICKA L, BRIDEAU AD, SUPEKOVA L, THIMME R, WIELAND S, BUKH J, PURCELL RH, SCHULTZ PG, CHISARI FV, 2002. Genomic analysis of the host response to hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:15669-15674.
- 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* 79:2689-2699.
- SUPPIAH V, MOLDOVAN M, AHLENSTIEL G, BERG T, WELTMAN M, ABATE ML, BASSENDINE M, SPENGLER U, DORE GJ, POWELL E, RIORDAN S, SHERIDAN D,

- SMEDILE A, FRAGOMELI V, MULLER T, BAHLO M, STEWART GJ, BOOTH DR, GEORGE J, 2009. IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. *Nat Genet* 41:1100-1104.
- SUZUKI T, ISHII K, AIZAKI H, WAKITA T, 2007. Hepatitis C viral life cycle. *Adv Drug Deliv Rev* 59:1200-1212.
- SYED GH, AMAKO Y, SIDDIQUI A, 2009. Hepatitis C virus hijacks host lipid metabolism. *Trends Endocrinol Metab.*
- TAI CL, CHI WK, CHEN DS, HWANG LH, 1996. The helicase activity associated with hepatitis C virus nonstructural protein 3 (NS3). *J Virol* 70:8477-8484.
- TANAKA Y, NISHIDA N, SUGIYAMA M, KUROSAKI M, MATSUURA K, SAKAMOTO N, NAKAGAWA M, KORENAGA M, HINO K, HIGE S, ITO Y, MITA E, TANAKA E, MOCHIDA S, MURAWAKI Y, HONDA M, SAKAI A, HIASA Y, NISHIGUCHI S, KOIKE A, SAKAIDA I, IMAMURA M, ITO K, YANO K, MASAKI N, SUGAUCHI F, IZUMI N, TOKUNAGA K, MIZOKAMI M, 2009. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet* 41:1105-1109.
- TANG H, GRISE H, 2009. Cellular and molecular biology of HCV infection and hepatitis. *Clin Sci (Lond)* 117:49-65.
- TARGETT-ADAMS P, HOPE G, BOULANT S, MCLAUCHLAN J, 2008. Maturation of hepatitis C virus core protein by signal peptide peptidase is required for virus production. *J Biol Chem* 283:16850-16859.
- TELLINGHUISEN TL, EVANS MJ, VON HT, YOU S, RICE CM, 2007. Studying hepatitis C virus: making the best of a bad virus. *J Virol* 81:8853-8867.
- TELLINGHUISEN TL, FOSS KL, TREADAWAY J, 2008a. Regulation of hepatitis C virion production via phosphorylation of the NS5A protein. *PLoS Pathog* 4:e1000032.
- TELLINGHUISEN TL, FOSS KL, TREADAWAY JC, RICE CM, 2008b. Identification of residues required for RNA replication in domains II and III of the hepatitis C virus NS5A protein. *J Virol* 82:1073-1083.
- TELLINGHUISEN TL, MARCOTRIGIANO J, GORBALENYA AE, RICE CM, 2004. The NS5A protein of hepatitis C virus is a zinc metalloprotein. *J Biol Chem* 279:48576-48587.

- TELLINGHUISEN TL, MARCOTRIGIANO J, RICE CM, 2005. Structure of the zinc-binding domain of an essential component of the hepatitis C virus replicase. *Nature* 435:374-379.
- TELLINGHUISEN TL, RICE CM, 2002. Interaction between hepatitis C virus proteins and host cell factors. *Curr Opin Microbiol* 5:419-427.
- THIMME R, OLDACH D, CHANG KM, STEIGER C, RAY SC, CHISARI FV, 2001. Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *J Exp Med* 194:1395-1406.
- TRIYATNI M, VERGALLA J, DAVIS AR, HADLOCK KG, FOUNG SK, LIANG TJ, 2002. Structural features of envelope proteins on hepatitis C virus-like particles as determined by anti-envelope monoclonal antibodies and CD81 binding. *Virology* 298:124-132.
- TROESCH M, MEUNIER I, LAPIERRE P, LAPOINTE N, ALVAREZ F, BOUCHER M, SOUDEYNS H, 2006. Study of a novel hypervariable region in hepatitis C virus (HCV) E2 envelope glycoprotein. *Virology* 352:357-367.
- 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* 80:1734-1741.
- UPRICHARD SL, CHUNG J, CHISARI FV, WAKITA T, 2006. Replication of a hepatitis C virus replicon clone in mouse cells. *Virol J* 3:89.
- VAN ECK M., HOEKSTRA M, OUT R, BOS IS, KRUIJT JK, HILDEBRAND RB, VAN BERKEL TJ, 2008. Scavenger receptor BI facilitates the metabolism of VLDL lipoproteins in vivo. *J Lipid Res* 49:136-146.
- VAN ITALLIE CM, ANDERSON JM, 2006. Claudins and epithelial paracellular transport. *Annu Rev Physiol* 68:403-429.
- VARAKLIOTI A, VASSILAKI N, GEORGOPOULOU U, MAVROMARA P, 2002. Alternate translation occurs within the core coding region of the hepatitis C viral genome. *J Biol Chem* 277:17713-17721.
- VOISSET C, CALLENS N, BLANCHARD E, OP DE BEECK A., DUBUISSON J, VU-DAC N, 2005. High density lipoproteins facilitate hepatitis C virus entry through the scavenger receptor class B type I. *J Biol Chem* 280:7793-7799.

- VOISSET C, OP DE BEECK A., HORELLOU P, DREUX M, GUSTOT T, DUVERLIE G, COSSET FL, VU-DAC N, DUBUISSON J, 2006. High-density lipoproteins reduce the neutralizing effect of hepatitis C virus (HCV)-infected patient antibodies by promoting HCV entry. *J Gen Virol* 87:2577-2581.
- VON HAHN T., YOON JC, ALTER H, RICE CM, REHERMANN B, BALFE P, MCKEATING JA, 2007. Hepatitis C virus continuously escapes from neutralizing antibody and T-cell responses during chronic infection in vivo. *Gastroenterology* 132:667-678.
- 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* 11:791-796.
- WALEWSKI JL, KELLER TR, STUMP DD, BRANCH AD, 2001. Evidence for a new hepatitis C virus antigen encoded in an overlapping reading frame. *RNA* 7:710-721.
- WANG C, GALE M, JR., KELLER BC, HUANG H, BROWN MS, GOLDSTEIN JL, YE J, 2005. Identification of FBL2 as a geranylgeranylated cellular protein required for hepatitis C virus RNA replication. *Mol Cell* 18:425-434.
- WANG TH, RIJNBAND RC, LEMON SM, 2000. 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* 74:11347-11358.
- WATASHI K, HIJIKATA M, HOSAKA M, YAMAJI M, SHIMOTOHNO K, 2003. Cyclosporin A suppresses replication of hepatitis C virus genome in cultured hepatocytes. *Hepatology* 38:1282-1288.
- WATASHI K, ISHII N, HIJIKATA M, INOUE D, MURATA T, MIYANARI Y, SHIMOTOHNO K, 2005. Cyclophilin B is a functional regulator of hepatitis C virus RNA polymerase. *Mol Cell* 19:111-122.
- WEINER A, ERICKSON AL, KANSOPON J, CRAWFORD K, MUCHMORE E, HUGHES AL, HOUGHTON M, WALKER CM, 1995. Persistent hepatitis C virus infection in a chimpanzee is associated with emergence of a cytotoxic T lymphocyte escape variant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:2755-2759.
- WEINER AJ, BRAUER MJ, ROSENBLATT J, RICHMAN KH, TUNG J, CRAWFORD K, BONINO F, SARACCO G, CHOO QL, HOUGHTON M, ., 1991. Variable and hypervariable

domains are found in the regions of HCV corresponding to the flavivirus envelope and NS1 proteins and the pestivirus envelope glycoproteins. *Virology* 180:842-848.

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* 280:29604-29611.

WELSCH S, MILLER S, ROMERO-BREY I, MERZ A, BLECK CK, WALTHER P, FULLER SD, ANTONY C, KRIJNSE-LOCKER J, BARTENSCHLAGER R, 2009. Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. *Cell Host Microbe* 5:365-375.

WHERRY EJ, AHMED R, 2004. Memory CD8 T-cell differentiation during viral infection. *J Virol* 78:5535-5545.

WHERRY EJ, BLATTMAN JN, MURALI-KRISHNA K, VAN DER MOST R., AHMED R, 2003. Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment. *J Virol* 77:4911-4927.

WOLF M, DIMITROVA M, BAUMERT TF, SCHUSTER C, 2008. The major form of hepatitis C virus alternate reading frame protein is suppressed by core protein expression. *Nucleic Acids Res* 36:3054-3064.

WOLK B, BUCHELE B, MORADPOUR D, RICE CM, 2008. A dynamic view of hepatitis C virus replication complexes. *J Virol* 82:10519-10531.

WOLK B, SANSONNO D, KRAUSSLICH HG, DAMMACCO F, RICE CM, BLUM HE, MORADPOUR D, 2000. Subcellular localization, stability, and trans-cleavage competence of the hepatitis C virus NS3-NS4A complex expressed in tetracycline-regulated cell lines. *J Virol* 74:2293-2304.

XIE ZC, RIEZU-BOJ JI, LASARTE JJ, GUILLEN J, SU JH, CIVEIRA MP, PRIETO J, 1998. Transmission of hepatitis C virus infection to tree shrews. *Virology* 244:513-520.

XU Z, CHOI J, LU W, OU JH, 2003. Hepatitis C virus f protein is a short-lived protein associated with the endoplasmic reticulum. *J Virol* 77:1578-1583.

XU Z, CHOI J, YEN TS, LU W, STROHECKER A, GOVINDARAJAN S, CHIEN D, SELBY MJ, OU J, 2001. Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift. *EMBO J* 20:3840-3848.

- YANG W, HOOD BL, CHADWICK SL, LIU S, WATKINS SC, LUO G, CONRADS TP, WANG T, 2008a. Fatty acid synthase is up-regulated during hepatitis C virus infection and regulates hepatitis C virus entry and production. *Hepatology* 48:1396-1403.
- YANG W, QIU C, BISWAS N, JIN J, WATKINS SC, MONTELARO RC, COYNE CB, WANG T, 2008b. Correlation of the tight junction-like distribution of Claudin-1 to the cellular tropism of hepatitis C virus. *J Biol Chem* 283:8643-8653.
- YE J, WANG C, SUMPTER R, JR., BROWN MS, GOLDSTEIN JL, GALE M, JR., 2003. Disruption of hepatitis C virus RNA replication through inhibition of host protein geranylgeranylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:15865-15870.
- YOU S, STUMP DD, BRANCH AD, RICE CM, 2004. A cis-acting replication element in the sequence encoding the NS5B RNA-dependent RNA polymerase is required for hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* 78:1352-1366.
- YU GY, LEE KJ, GAO L, LAI MM, 2006. Palmitoylation and polymerization of hepatitis C virus NS4B protein. *J Virol* 80:6013-6023.
- ZEIN NN, 2000. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *Clin Microbiol Rev* 13:223-235.
- ZEISEL MB, BARTH H, SCHUSTER C, BAUMERT TF, 2009. Hepatitis C virus entry: molecular mechanisms and targets for antiviral therapy. *Front Biosci* 14:3274-3285.
- 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* 46:1722-1731.
- ZHANG J, YAMADA O, YOSHIDA H, IWAI T, ARAKI H, 2002. Autogenous translational inhibition of core protein: implication for switch from translation to RNA replication in hepatitis C virus. *Virology* 293:141-150.
- ZHAO X, TANG ZY, KLUMPP B, WOLFF-VORBECK G, BARTH H, LEVY S, VON WF, BLUM HE, BAUMERT TF, 2002. Primary hepatocytes of *Tupaia belangeri* as a potential model for hepatitis C virus infection. *J Clin Invest* 109:221-232.

- ZHENG A, YUAN F, LI Y, ZHU F, HOU P, LI J, SONG X, DING M, DENG H, 2007. Claudin-6 and claudin-9 function as additional coreceptors for hepatitis C virus. *J Virol* 81:12465-12471.
- 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* 102:9294-9299.

Résumé

Le virus de l'hépatite C (VHC) infecte 3% de la population mondiale et est responsable d'hépatites chroniques et de cancer du foie. C'est un problème majeur de santé publique, qui ne peut se résoudre qu'en recherchant de nouvelles solutions thérapeutiques. Deux étapes-clés du cycle viral ont été étudiées durant ma thèse: l'entrée et l'assemblage/sécrétion. L'entrée du virus dans la cellule hôte fait intervenir différents récepteurs cellulaires dont les protéines de jonction, claudin1 (CLDN1). Nous avons produits des anticorps anti-CLDN1 pour étudier le rôle de cette protéine dans l'entrée virale en comparaison aux récepteurs CD81 et SRB1. Nous avons montré que l'entrée du VHC implique une coopération étroite entre les récepteurs cellulaires SR-BI, CD81 et CLDN1, avant l'internalisation du virus et que les anticorps anti-CLDN1 produits étaient capables d'inhiber l'entrée virale et donc l'infection. De tels anticorps pourraient constituer des inhibiteurs d'entrée virale utilisables à des fins thérapeutiques.

L'assemblage et la sécrétion des virions sont étroitement liés au processus de maturation et de sécrétion des VLDL. Nous avons montré que la protéine hépatique, apolipoprotéine E (apoE), interagissait avec la protéine virale NS5A et que cette protéine est un facteur nécessaire à la production des particules infectieuses. De plus, nos expériences suggèrent qu'apoE serait impliquée dans l'assemblage et la sécrétion des particules virales VHC. Ainsi, des molécules thérapeutiques visant apoE pourraient être bénéfiques pour lutter contre l'hépatite C. L'ensemble de mes travaux montrent que de nouvelles cibles thérapeutiques peuvent être envisagées dans la lutte contre le VHC.

Mots clés: Apolipoprotéine E, assemblage, claudin1, entrée virale, inhibiteur d'entrée, métabolisme lipidique, virus de l'hépatite C.

Summary

The hepatitis C virus (HCV) infects an estimated 3% of the world's population and is a major cause of chronic hepatitis and liver cancer. It is a major problem of public health that can only be solved by seeking new therapeutic solutions. Two important steps in the viral life cycle have been studied during my thesis: entry and assembly/egress. Viral entry into host cells requires various cellular co-receptors among them the tight junction protein claudin1 (CLDN1). We have produced anti-CLDN1 antibodies to study the role of this protein in viral entry and demonstrate that CLDN1, CD81 and SRB1 act in cooperation before virus internalization. The anti-CLDN1 antibodies obtained were able to inhibit viral entry and HCV infection. Thus, development of neutralizing anti-CLDN1 antibodies may provide new therapeutic options for the prevention of HCV infection.

The VLDL pathway has been shown to play an important role in assembly and egress of infectious viral particles. We have shown that a liver protein, apolipoprotein E (apoE), interacts with the viral protein NS5A and that apoE is important for assembly and secretion of infectious particles. Thus, therapeutics targeting apoE could be candidates in the fight against HCV infection. All together my PhD thesis results show that in the future new therapeutic avenues can be proposed in the fight against HCV infection.

Key words: Apolipoprotein E, assembly, claudin1, viral entry, entry inhibitor, lipid metabolism, hepatitis C virus.