



**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 Isabel FOFANA**

**Prévention de la réinfection par le virus de l'hépatite C lors  
de la transplantation hépatique par l'utilisation d'anticorps  
monoclonaux anti-récepteur**

**Présentée et soutenue publiquement le 03 Décembre 2010**

**Membres du jury :**

**Rapporteur externe : Dr. Eve-Isabelle PECHEUR, CR, CNRS UMR 5086, HDR, Lyon**  
**Rapporteur externe : Dr. Camille SUREAU, DR, INTS, HDR, Paris**  
**Rapporteur interne : Pr. Sylvie FOURNEL, PU, CNRS UPR 9021, UdS, Strasbourg**  
**Directeur de thèse : Pr. Françoise STOLL-KELLER, PU-PH, INSERM U748, UdS, Strasbourg**  
**Co-directeur de thèse : Pr. Thomas BAUMERT, PU-PH, INSERM U748, UdS, Strasbourg**

## REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord remercier les membres de mon jury qui me font l'honneur de juger ce travail de thèse. Je remercie le Dr. Eve-Isabelle Pêcheur et le Dr. Camille Sureau d'avoir accepté la charge d'être rapporteur externe de mon travail de thèse. Je remercie de même le Pr. Sylvie Fournel qui, après avoir jugé mon travail à mi-parcours lors de mon Comité de thèse, a accepté d'être encore une fois rapporteur interne.

Je voudrais sincèrement remercier le Pr. Thomas Baumert, directeur de l'unité U748 et mon directeur de thèse. Merci de m'avoir donnée la chance de travailler dans ton équipe. Merci pour ton encadrement, ton dynamisme, ton soutien.

Merci aussi au Pr. Françoise Stoll-Keller, ma directrice de thèse, qui m'a suivie tout au long de ma thèse malgré un emploi du temps très chargé. Merci pour tous ces moments passés dans votre bureau à parler à la fois de travail mais aussi pour m'avoir écoutée pendant mes moments de doutes.

Je tiens à remercier profondément le Dr. Jean-Pierre Martin. Merci Jean-Pierre de m'avoir encadrée durant mon stage de M2. Merci de m'avoir appris toutes ces techniques qui m'ont permises d'avancer dans ma thèse. Et surtout merci de ne m'avoir jamais abandonnée, malgré le fait que tu partais à la retraite, et de m'avoir mise en de bonnes mains pour ma thèse !

Voilà quatre années qui viennent de s'écouler. Le travail fut intense et cela n'aurait pas été aussi simple si je n'avais pas été entourée de tant de collègues et d'amis.

Merci à Samira. Merci de m'avoir toujours encouragée dans mon travail. Merci pour toutes ces discussions, à la fois sur le travail, mais aussi sur « tout et rien », qui m'ont permises parfois de décompresser quand les journées devenaient longues.

Merci à ma chère Michèle. Michèle, ces quatre années n'auraient pas été les mêmes si je ne les avais pas passées en ta présence. Tu as toujours été là quand je ne savais plus vers qui me tourner. Merci pour ton aide au travail. Merci pour, pareil, toutes nos discussions (et il y en a eu!).

Merci à Mirjam. Merci pour ta disponibilité dans le travail. Merci pour ton aide lorsque je cherchais des réponses à mes questions. Merci pour ta bonne humeur constante. Merci tout simplement pour tout.

Merci à mon voisin de bureau Joachim. On en a passé des bons moments! Entre les cours de français que je te donnais, ta façon de toujours étaler toutes tes affaires sur mon bureau. Merci pour ton sourire tous les matins quand j'arrivais au labo.

Merci à Marine, Laetitia, Alizé, Karine, Daniel, Nauman, Patric, Valentin, Marina, Richard, Julien, Géraldine, Thomas pour tous ces moments de fou-rires à la fois à la cafeteria (avec les mots croisés), sur la terrasse pour une petite pause, et dans le bureau des thésards. Soyez toujours là les uns pour les autres, vous êtes vraiment géniaux !

Merci à Christine, Catherine S, Cathy, Mélanie, Jochen, Heidi, Fei, Laura, Sarah, Evelyne, Marie et Eric pour votre aide dans mon travail et vos conseils.

Merci à Patricia, Corinne, Rosalba, Dominique et Sigis pour leur aide indispensable dans la vie du laboratoire mais aussi pour votre bonne humeur et nos petites discussions dans les couloirs.

Merci à Catherine C, Anne, Joëlle, Hélène et Véronique pour leur efficacité et leur gentillesse.

Merci aux équipes HIV, Christiane, Vincent, Olivier et Christian pour tous leurs bons conseils.

Merci à tous ceux que je n'ai pas cités.

Merci aux filles du diagnostique pour leur bonne humeur et dans l'aide qu'elles m'ont apportée avec tous les prélèvements que l'on devait analyser.

Merci à mes amis pour m'avoir écoutée et aidée pendant toutes ces années.

Merci à Barbara. Merci d'avoir toujours été présente dans ma vie, pendant les bons moments mais aussi pendant les moments un peu plus durs. Merci pour ton amitié.

Merci à Isabella. Merci pour ton soutien, pour ta bonne humeur, pour ton amitié aussi.

Merci à Kristel. Merci pour tes blagues pour me remonter le moral, pour toutes les fois où tu ne m'as pas laissée tomber quand j'annulais toujours nos rendez-vous.

Merci à Djalil pour toutes nos discussions autour d'un café.

Merci à tous mes amis en général pour leur soutien et compréhension.

Merci, tout particulièrement, à mon cher Pierre-Jean. Merci de m'avoir supportée pendant ces dernières années. Ce n'étaient pas les plus faciles. Merci d'avoir toujours été là, de m'avoir relevée quand parfois ça allait mal. Merci pour tout.

Je tiens finalement à remercier mes parents, Heike et André, ainsi que mes sœurs Christine et Gisèle et mon frère Patrick. Merci de m'avoir permise de faire mes études tranquillement sans me soucier du quotidien. Merci d'avoir toujours cru en moi.

# TABLE DES MATIERES

<b>INTRODUCTION</b> .....	5
A. Le virus de l'hépatite C .....	6
i. Propriétés biophysiques du virus de l'hépatite C .....	6
ii. Du génome aux protéines virales.....	7
1. Les régions non traduites .....	8
2. Les protéines virales .....	9
iii. Variabilité génétique du VHC .....	12
B. Les modèles d'étude du VHC .....	14
i. Les modèles <i>in vitro</i> .....	14
ii. Les modèles animaux .....	18
C. Le cycle viral.....	20
i. Les multiples facteurs d'entrée.....	20
ii. L'entrée du virus : un processus multifactoriel .....	25
D. L'hépatite C : la maladie .....	30
i. Epidémiologie, manifestations cliniques et traitement.....	30
ii. L'infection par le VHC dans le contexte de la transplantation hépatique .....	34
iii. Rôle des anticorps neutralisants dans la pathogénie du VHC .....	36
<b>OBJECTIFS</b> .....	39
<b>RESULTATS</b> .....	41
<b>DISCUSSION</b> .....	47
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</b> .....	55
<b>REFERENCES</b> .....	57



# TABLE DES ILLUSTRATIONS

<b>Figure 1 :</b> Représentation schématique du VHC .....	6
<b>Figure 2 :</b> Organisation génomique du VHC .....	8
<b>Figure 3:</b> Production des pseudo-particules rétrovirales du VHC (VHCpp) .....	16
<b>Figure 4 :</b> Production de particules virales VHC produites en culture cellulaire (VHCcc) .....	18
<b>Figure 5:</b> Représentation schématique de CLDN1 .....	23
<b>Figure 6:</b> Entrée du VHC dans les hépatocytes .....	29
<b>Figure 7 :</b> Prévalence de l'infection par le VHC dans le monde (source, OMS 2007) .....	31
<b>Figure 8 :</b> Histoire naturelle de l'infection par le VHC .....	32
<b>Figure 9 :</b> Cinétique des marqueurs de l'infection aiguë (A) et chronique (B) .....	33
<b>Figure 10:</b> Entrée du VHC dans les hépatocytes: cibles des thérapies antivirales .....	51
<b>Tableau 1 :</b> Variabilité génétique du VHC .....	14

## ABBREVIATIONS

ALAT	Alanine aminotransférase
Alb-uPa	Albumine urokinase-type plasminogen activator
Apo	Apolipoprotéine
ARF	Alternative reading frame
CHC	Carcinome hépatocellulaire
CLDN	Claudine
CR	Complexe de réplication
DC	Cellule dendritique
EL	Extracellular loop
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
GAG	Glycosaminoglycane
GFP	Green fluorescent protein
HDL	High density lipoprotein
HVR	Région hypervariable
Ig	Immunoglobuline
IRES	Site d'entrée interne du ribosome
JFH1	Japanese fulminant hepatitis
Kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LDL	Low density lipoprotein
LDL-R	Récepteur aux LDL
LEL	Large extracellular loop
MLV	Virus de la leucémie murine
nm	Nanomètre
NS	Non structurale

NTR	Non traduite
OCLN	Occludine
ORF	Open reading frame
PBH	Ponction biopsie hépatique
RE	Réticulum endoplasmique
RFP	Red fluorescent protein
RVS	Réponse virologique soutenue
SCID	severe combined immunodeficiency disorder
SEL	Small extracellular loop
sE2	Forme soluble de la glycoprotéine E2
siARN	ARN interférent
SL	Stem loop
SP	Signal peptidase
SPP	Signal peptide peptidase
SR-BI	Scavenger receptor class B type I
VHC	Virus de l'hépatite C
VHCcc	particules virales VHC produites en culture cellulaire
VHCpp	Pseudoparticules du VHC
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
VLDL	Very low density lipoprotein
VLP	Virus-like particules

# INTRODUCTION

L'infection par le virus de l'hépatite C (VHC) représente un problème majeur de santé publique. En effet, après la primo-infection, le VHC persiste dans l'organisme dans plus de 70% des cas, malgré la présence d'une réponse immunitaire cellulaire et humorale spécifique. L'infection évolue silencieusement vers l'hépatite chronique puis vers la cirrhose chez 15 à 20% des patients, dans les 15 à 20 années suivantes, avec un risque de cancer du foie de 5% par an. La cirrhose terminale et le carcinome hépatocellulaire associés au VHC sont les indications majeures de transplantation hépatique (TH). Le délai entre la contamination et la survenue des complications hépatiques nécessitant une greffe du foie suggère que le pic de l'impact social et économique de l'épidémie du VHC surviendra probablement dans les 10 à 20 prochaines années. La réinfection du greffon par le VHC se produit chez pratiquement tous les patients après transplantation et évolue vers une infection persistante, qui conduit à une hépatite chronique et une cirrhose dans une proportion importante de patients. Le traitement actuel à base d'interféron pégylé et de ribavirine est peu efficace et mal toléré par ce type de patients. A ce jour, il n'y a pas de traitement disponible pour prévenir la réinfection du greffon hépatique par le VHC. Le développement de nouvelles stratégies antivirales reste donc un enjeu important.

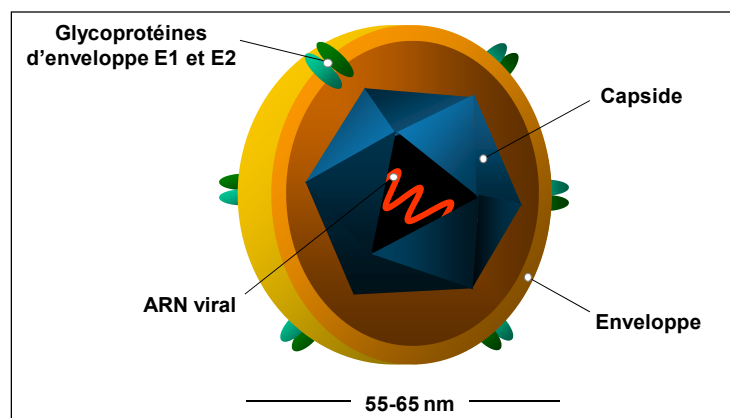
L'absence de données sur les mécanismes impliqués dans l'infection par le VHC, lors de la transplantation, a longtemps constitué un obstacle pour le développement de stratégies antivirales efficaces. Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires de la réinfection du greffon est ainsi nécessaire pour permettre le développement de nouvelles stratégies antivirales préventives.

Les travaux de thèse présentés dans ce manuscrit se sont tout d'abord intéressés aux phases précoces de la réinfection, afin d'en déterminer les mécanismes moléculaires. L'étude de la neutralisation des variants VHC conduisant à la réinfection systématique du greffon nous a ensuite mené à la production et à la caractérisation d'anticorps monoclonaux qui pourraient être utilisés en tant qu'immunothérapie passive afin d'éviter la réinfection du greffon. Après une synthèse bibliographique sur les connaissances actuelles concernant l'hépatite C, les résultats inhérents à nos travaux sont présentés sous forme d'articles scientifiques d'ores et déjà acceptés à la publication ou soumis, finalement, la dernière partie présente les perspectives liées à ce sujet.

## A. Le virus de l'hépatite C

### i. Propriétés biophysiques du virus de l'hépatite C

Le VHC est un petit virus enveloppé, de 55 à 65 nm de diamètre (Kaito et al. 1994; Shimizu et al. 1996), appartenant à la famille des *Flaviviridae*. Cette famille est subdivisée en trois genres : les *Flavivirus* souvent responsables d'arboviroses (virus de la fièvre jaune, virus de la dengue et virus de l'encéphalite à tique), les *Pestivirus* responsables de pathologies animales (virus de la peste porcine, virus de la diarrhée bovine) et les *Hepacivirus* (du grec hepar, hepatos, foie) dont le VHC est le seul représentant. Le génome du VHC à ARN monocaténaire de polarité positive de 9.6 kb (Choo et al. 1989) est constitué d'une région non traduite en 5' (5'NTR), comportant le site d'entrée interne du ribosome (IRES), d'un cadre ouvert de lecture (ORF) codant pour les protéines structurales et non structurales, et d'une région non traduite en 3' (3'NTR). L'enveloppe du VHC est dérivée de la bicouche lipidique de l'hôte et contient les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2. La nucléocapside renferme quant à elle la protéine de capsidite et l'ARN génomique (Figure 1).

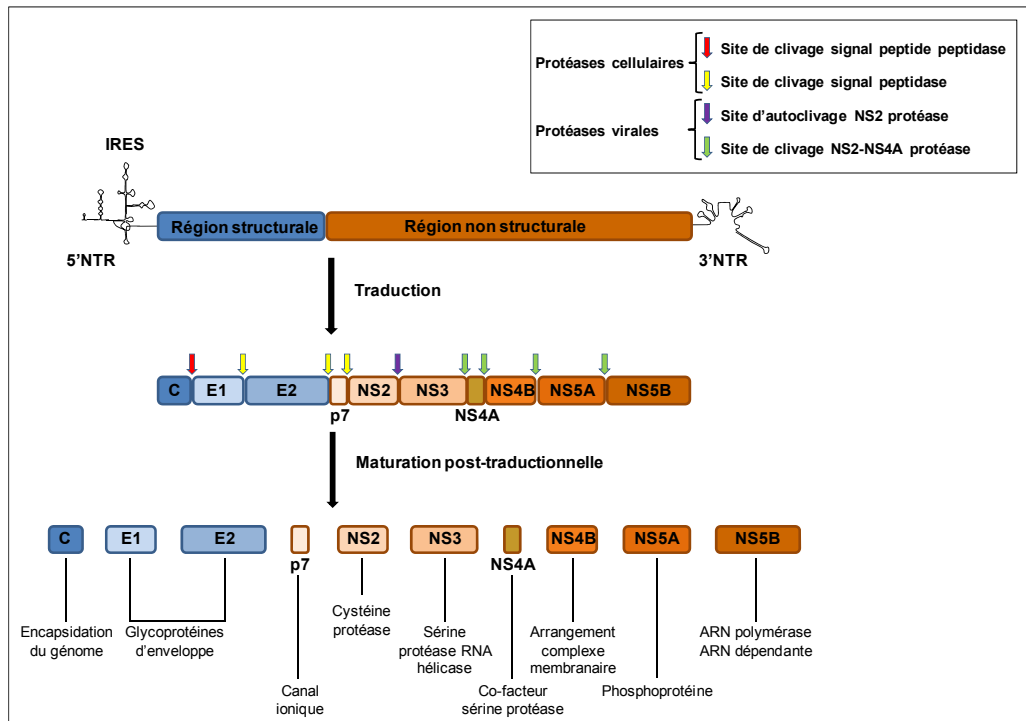


**Figure 1 : Représentation schématique du VHC.** Le VHC est un petit virus enveloppé de 55 à 65 nm de diamètre. Son génome est un ARN monocaténaire de polarité positive d'environ 9600 nucléotides. Il est contenu dans une capsidite protéique icosaédrique, elle-même située à l'intérieur d'une enveloppe lipidique dans laquelle sont insérées les glycoprotéines d'enveloppes E1 et E2.

Plusieurs études ont démontré que le VHC circule sous diverses formes dans le sang des patients infectés. Il peut être associé aux lipoprotéines et présente une distribution hétérogène sur gradient de sucrose. Il existe des particules de faible densité (1,03 à 1,08 g/ml) et des particules de haute densité (1,17 à 1,25 g/ml) (Andre et al. 2002). Les particules associées aux lipoprotéines de faible densité (LDL) et de très faible densité (VLDL) sont plus infectieuses que celles de plus haute densité, associées à des immunoglobulines. Les particules infectieuses de faible densité sont appelées des lipo-viro-particules (LVP). Ce sont des particules sphériques riches en triglycérides, les apolipoprotéines B et E (ApoB ou ApoE), contenant la capsid virale et l'ARN ainsi que les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 (Andre et al. 2002).

## ii. Du génome aux protéines virales

Le génome du VHC code une polyprotéine précurseur, d'environ 3010 acides aminés, qui est clivée, de manière co- et post-traductionnelle, par des protéases virales et cellulaires en 10 protéines virales : (i) les **protéines structurales** qui sont la protéine de capsid ou protéine C, les protéines d'enveloppe E1 et E2, et la protéine p7, et (ii) les **protéines non structurales** NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B (Moradpour et al. 2007) (Figure 2).



**Figure 2 : Organisation génomique du VHC.** Le génome du VHC comprend un ARN positif de 9,6 kb. La région 5'NTR, contenant l'IRES, est suivie d'un cadre de lecture ouvert codant pour les protéines structurales et les protéines non structurales, et de la région 3'NTR nécessaire pour la réplication. La polyprotéine d'environ 3010 acides aminés est clivée de manière co- et post-traductionnelle par des protéases cellulaires et virales pour donner les protéines structurales (en bleue) et les protéines non structurales (en marron). Les flèches représentent les clivages protéolytiques

## 1. Les régions non traduites

La région 5'NTR, très conservée et structurée, assure la traduction du cadre ouvert de lecture. L'IRES couvre une région d'environ 341 nucléotides (nt) qui comprend la majeure partie de 5'NTR et 24 à 40 nt de la région codant la protéine C. L'IRES est indispensable à la traduction coiffe-dépendante de l'ARN viral. La région 5'NTR forme une structure tertiaire comprenant 4 domaines distincts, I à IV. Les domaines II, III et IV sont indispensables à l'activité IRES. Il a été suggéré que la région 5'NTR contient à la fois 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 (i) la séquence en amont de l'IRES est essentielle pour la réplication de l'ARN viral (Friebe et al. 2001), (ii) des séquences dans l'IRES sont nécessaires à la réplication efficace du virus (Friebe et al. 2001) et (iii) la tige-boucle du domaine II de l'IRES est cruciale pour la réplication (Appel et al. 2006). *In vitro*, il a été montré qu'un micro-ARN, miR-122, abondamment exprimé

dans le foie, a la capacité de faciliter la réplication virale du VHC en se fixant sur l'IRES (Jopling et al. 2005). *In vivo*, chez le chimpanzé, il a été montré que la suppression d'expression de miR-122 entraîne une diminution de charge virale VHC (Lanford et al. 2010).

La **région 3'NTR**, d'environ 200 nt, joue un rôle important dans la réplication virale. Elle est composée de 3 domaines : (i) une séquence interne uracile/pyrimidine (poly (U/UC)) d'une taille moyenne de 80 nt, (ii) d'une région variable et (iii) d'une séquence de 98 nt, appelée la région X, comprenant trois tige-boucles (3'SLI, 3'SLII et 3'SLIII). Cette dernière séquence joue un rôle important dans l'initiation de la synthèse du brin ARN négatif au cours de la réplication.

## 2. Les protéines virales

La première protéine structurale codée par le génome du VHC est la **protéine de capsid** ou **protéine C (core)**. Celle-ci forme la nucléocapside virale. Elle est clivée par un signal peptidase (SP) cellulaire en une forme immature de 23 kDa, puis par un signal peptide peptidase (SPP) cellulaire en une protéine mature de 21 kDa de 173 à 179 acides aminés (McLauchlan et al. 2002). Le domaine N-terminal, riche en acides aminés basiques, est impliqué dans la liaison à la région 5'NTR de l'ARN viral permettant la formation de la nucléocapside. La protéine C s'associe aux gouttelettes lipidiques au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique (RE) (McLauchlan et al. 2002). Le domaine C-terminal, riche en acides aminés hydrophobes, assure cette localisation ainsi que la stabilité de la protéine C (Boulant et al. 2006). La protéine C joue un rôle essentiel dans l'assemblage et la libération des virus infectieux, mais elle intervient également au moment du désassemblage des particules virales, lors de l'entrée dans la cellule (Penin et al. 2004; Miyanari et al. 2007).

Une protéine additionnelle, provenant d'un cadre de lecture alternatif (ARF) chevauchant la séquence codant la protéine C dans le cadre +1 a été identifiée. Cette protéine, nommée **protéine F (frameshift), ou protéine ARF (alternative reading frame) ou core +1**, est une protéine de 17 kDa qui, après traduction, est localisée dans le RE. Sa durée de vie est très courte, d'environ 10 minutes, car elle est dégradée par le protéasome (Xu et al. 2003). L'expression d'une forme tronquée de la protéine F (8kDa) est inversement proportionnelle à la synthèse de la protéine C, ce qui pourrait expliquer le faible taux d'expression de cette protéine durant



l'infection virale (Wolf et al. 2008). La détection d'anticorps et de cellules T spécifiques de la protéine F chez des patients infectés par le VHC suggère qu'elle est produite *in vivo* (Bain et al. 2004; Gao et al. 2008). La fonction de la protéine F n'est pas connue. Elle n'est pas essentielle à la réplication virale ni à la production de particules infectieuses, mais pourrait agir comme un facteur de régulation (Branch et al. 2005).

Les **protéines d'enveloppe E1 et E2** sont les constituants essentiels de l'enveloppe et sont indispensables à l'entrée du VHC dans les cellules cibles. Elles sont clivées par des signaux peptidases cellulaires (Dubuisson et al. 2002). E1 et E2 sont des protéines transmembranaires de type I comprenant chacune un grand domaine transmembranaire N-terminal de 160 à 334 acides aminés respectivement, et un court domaine C-terminal d'une trentaine d'acides aminés hydrophobes (Cocquerel et al. 2000). La protéine E1 a un poids moléculaire d'environ 31 kDa et E2 d'environ 70 kDa. Les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 associées au virion fonctionnel et responsables de l'entrée virale forment des complexes covalents stabilisés par des ponts disulfures (Vieyres et al. 2010). Les domaines N-terminaux contiennent jusqu'à 6 et 11 sites de glycosylation potentiels pour E1 et E2, respectivement, qui sont bien conservés (Op De Beeck et al. 2000). Les glycanes de E2 sont essentielles pour la biogénèse et la fonctionnalité du complexe formé par les glycoprotéines (Goffard et al. 2005). La synthèse et la glycosylation des protéines E1 et E2 ont lieu dans le RE. Le rôle exact de la protéine E1 dans l'infection par le VHC reste encore mal compris. Elle semble cependant être impliquée dans le processus de fusion à la membrane, nécessaire à l'internalisation du virus dans la cellule hôte (Lavillette et al. 2007). La protéine E2 est la cible préférentielle de la réponse immunitaire. Deux régions hypervariables (HVR1 et HVR2) ont été identifiées (Weiner et al. 1991) aux positions d'acides aminés 384-410 et 474-480. La région HVR1 est très hétérogène dans sa séquence et est responsable de variations dans l'infectivité des particules du VHC chez les patients, et au sein d'un même patient (quasi-espèces) (cf chapitre A, iii et D, ii). Grâce à cette forte variabilité, le virus peut facilement échapper au système immunitaire de l'hôte et persister (von Hahn et al. 2007). Il a été montré dans le modèle chimpanzé que la délétion de la région HVR1 rendait le virus moins infectieux (Forns et al. 2000) confirmant un rôle fonctionnel de la région HVR1, notamment dans l'entrée du virus (Callens et al. 2005; Bankwitz et al. 2010). D'un point de vue conformationnel, la région HVR1 est très conservée ce qui est cohérent avec le rôle qu'elle joue en tant que cible de la réponse immunitaire et dans l'attachement du virus à la cellule (Penin et al. 2001). Le rôle

fonctionnel de la région HVR2 est moins bien défini. Cette région semble être impliquée dans la liaison de E2 aux facteurs cellulaires tels CD81 (Roccasecca et al. 2003). Une troisième région, située aux acides aminés 431-466, comprise entre les régions HVR1 et HVR2 (Troesch et al. 2006) a été identifiée. Cette région, nommée HVR3, semble aussi être impliquée dans la liaison du virus aux facteurs cellulaires.

La **protéine p7** est issue d'un clivage incomplet de la protéine E2. Elle est constituée de 63 acides aminés. Ces fonctions sont encore mal connues. Cette protéine s'oligomérisse pour former un canal ionique d'où son assimilation aux viroporines (Luik et al. 2009). Elle semble nécessaire à l'infection, étant donné qu'elle est essentielle à l'infection par le VHC des chimpanzés (Sakai et al. 2003) mais pas à la réplication de l'ARN. Elle est nécessaire à l'assemblage des particules virales et la sécrétion des virions (Steinmann et al. 2007).

Les protéines non structurales sont indispensables pour la réplication, la traduction et l'assemblage du VHC.

La **protéine NS2** est une protéine transmembranaire de 21-23 kDa, non essentielle à la réplication, mais impliquée dans la production de particules virales infectieuses (Jones et al. 2007). Ceci suggère que NS2 pourrait agir dans la morphogénèse du VHC. NS2 forme avec le tiers de la partie N-terminale de NS3 une **protéase NS2-3** (Lindenbach et al. 2001), qui est une autoprolyse responsable du clivage entre les protéines non structurales NS2 et NS3. C'est un facteur essentiel du cycle répliatif du VHC *in vitro* et *in vivo* (Pietschmann et al. 2006).

La **protéine NS3** est une protéine multifonctionnelle possédant en son domaine C-terminal une activité sérine protéase et hélicase/NTPase (Tai et al. 1996). La **protéine NS4A** fonctionne comme un cofacteur de la sérine protéase. Le complexe NS3-4A permet le clivage des protéines non structurales en aval de NS3. L'activité hélicase de NS3 est nécessaire à la réplication de l'ARN, en participant à la séparation des ARN double brin ou au déroulement des structures secondaires. Récemment, la protéine NS3 a été impliquée dans les étapes précoces de la morphogénèse des particules virales : elle intervient dans le recrutement de NS5A aux gouttelettes lipidiques et à l'assemblage de particules infectieuses (Ma et al. 2008).

La **protéine NS4B** est mal connue. C'est une protéine hydrophobe, de 27 kDa, intégralement associée aux membranes du RE (Hugle et al. 2001). Elle induit la formation d'un

compartiment membranaire spécialisé, dérivé des membranes du RE, appelé « complexes de réplication » ou « membranous web » qui est le siège de la réplication virale (Egger et al. 2002).

La **protéine NS5A** est une phosphoprotéine, de 56-58 kDa, ancrée dans la membrane du RE par son extrémité N-terminale qui est repliée en une hélice  $\alpha$  amphiphile (H1) (Penin et al. 2004) impliquée dans les interactions protéine-protéine nécessaires à l'assemblage d'un complexe de réplication fonctionnel. La protéine NS5A est composée de trois domaines distincts (I, II et III). Le domaine III a récemment été identifié comme élément clé dans l'assemblage des particules virales (Appel et al. 2008). Ce domaine est une des régions les plus variables du génome du VHC. La protéine NS5A interagit avec l'apolipoprotéine ApoE qui est requise pour l'assemblage et l'export des virions infectieux (Benga et al. 2010).

La **protéine NS5B** est une ARN polymérase ARN-dépendante (RpRd). Elle joue le rôle de catalyseur au sein de la machinerie de réplication du VHC. NS5B est ancrée dans la membrane du RE par son domaine transmembranaire C-terminal. L'association de NS5B à la membrane du RE est indispensable à la réplication du VHC (Moradpour et al. 2004). L'activité de NS5B est modulée par des interactions avec les protéines virales NS3 et NS5A (Bartenschlager et al. 2004). Les études de cristallographie montrent une structure 3D en main droite, pouce-paume-doigts, commune à la plupart des polymérases. Cette protéine est une cible majeure des nouveaux antiviraux.

### iii. Variabilité génétique du VHC

Le VHC présente une grande variabilité génétique. Cette variabilité est le résultat de l'absence d'activité exonucléasique correctrice de l'ARN polymérase ARN-dépendante, mais également du niveau élevé de réplication *in vivo* ( $10^{10}$  à  $10^{12}$  nouveaux virions par jour) (Neumann et al. 1998). La fréquence moyenne de mutation nucléotidique par site et par an varie de  $1,4 \times 10^3$  à  $1,9 \times 10^3$  (Ogata et al. 1991). La région 5'NTR est l'une des régions les plus conservées du génome avec plus de 90% d'homologie entre les séquences de différentes souches (Bukh et al. 1992). La région codant la capsid est également très conservée avec 81 à 88% d'homologie de séquences entre isolats (Simmonds et al. 1994). La région la plus variable du génome du VHC est la région codant les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2. En effet, les

séquences codant les régions hypervariables HVR1, 2 et 3 de E2 peuvent varier de 50% d'une souche à l'autre (Troesch et al. 2006).

La classification du VHC a été réalisée par des approches de phylogénie qui ont permis de classer les variants du VHC en 6 **génotypes** (1 à 6) pouvant être subdivisés en de multiples **sous-types** (1a, 1b, 2a....) (Simmonds et al. 2005). Les génotypes diffèrent les uns des autres par une variabilité de séquence nucléotidique de 30-50% et les sous-types par une variabilité de 20-25% sur l'ensemble du génome. Le génotype 1a est le plus fréquent en Europe du Nord et aux Etats-Unis d'Amérique. Le génotype 1b est le plus fréquent en général, avec une distribution géographique mondiale. Les génotypes 2a et 2b, qui représentent 10 à 30 % des génotypes du VHC, sont retrouvés principalement en Italie du nord et au Japon, avec aussi une distribution géographique mondiale. Le génotype 3 est retrouvé dans le sous-continent Indien, le génotype 4 est fréquemment retrouvé au Moyen-Orient et en Afrique. Les génotypes 5 et 6 sont relativement rares, mais peuvent être détectés en France, en Afrique du sud et en Asie du sud-est, respectivement. La détermination du génotype est primordiale puisque les génotypes 1 et 4 sont plus résistants que les génotypes 2 ou 3 au traitement par l'interféron- $\alpha$  pégylé et la ribavirine, avec des taux de réponse au traitement variant de 42-46% et de 76-80% respectivement (Neumann et al. 1998), et la durée du traitement est adaptée au génotype.

En raison de sa grande variabilité liée à l'ARN polymérase, le VHC circule chez les patients infectés sous forme de **quasi-espèces** virales, c'est-à-dire sous la forme d'un mélange complexe et en équilibre instable de variants viraux génétiquement distincts mais apparentés (Bukh et al. 1995). Les quasi-espèces diffèrent de 1 à 5% dans leurs séquences nucléotidiques. La présence de variants viraux distincts permet la sélection rapide et continue des variants les mieux adaptés à l'environnement dans lequel le virus se réplique. Cette capacité d'adaptation du VHC joue un rôle déterminant dans la physiopathologie de l'infection, dans les mécanismes de persistance virale et dans la résistance aux traitements antiviraux (von Hahn et al. 2007; Rong et al. 2010).

Désignation	Nomenclature	Degré de variation
Génotype	1 à 6	30 % à 50 %
Sous-type	a, b, c, ...	20 % à 25 %
Isolat		5 % à 15 %
Quasi-espèce		1 % à 5%

**Tableau 1 : Variabilité génétique du VHC.**

## B. Les modèles d'étude du VHC

L'absence d'un système de culture robuste a longtemps été un obstacle pour l'étude du cycle viral du VHC. Le plasma dérivé de patients infectés par le VHC a été utilisé dans un premier temps pour infecter des cultures cellulaires. A cause de la faible réplication du virus dans ce système, l'évaluation de l'infection était basée uniquement sur la RT-PCR. Cette approche s'est rapidement révélée insuffisante car elle ne permettait pas de déterminer de manière claire la présence d'une réelle réplication virale. Le développement d'autres systèmes *in vitro* plus robustes a permis de contourner ce problème et d'explorer les différentes étapes du cycle viral du VHC (Barth et al. 2006). Ces systèmes incluent les glycoprotéines d'enveloppe solubles et chimériques, les « virus-like » particules (VLP), les pseudo-particules (VHCpp) pour l'étude de l'entrée du VHC, les réplicons subgénomiques et génomiques, et plus récemment le modèle de culture cellulaire du VHC recombinant infectieux (VHCcc) pour l'étude du cycle complet du VHC.

### i. Les modèles *in vitro*

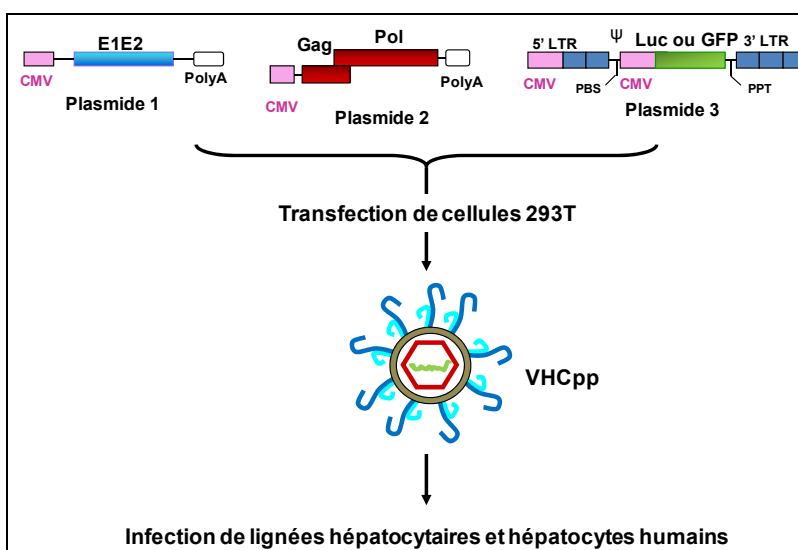
La **forme soluble tronquée de la glycoprotéine d'enveloppe E2 (sE2)**, dont le domaine transmembranaire a été délété (Michalak et al. 1997), a permis l'identification de facteurs cellulaires impliqués dans l'attachement et/ou l'entrée du VHC, tels que la tétraspanine CD81

(Pileri et al. 1998), le récepteur scavenger BI (SR-BI) (Scarselli et al. 2002) et les héparanes sulfates (Barth et al. 2003). Néanmoins, les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 étant présentes dans la particule virale sous forme d'un hétérodimère, la protéine sE2 ne permettait pas d'explorer l'étape de l'attachement et/ou l'entrée virale médiée par les deux glycoprotéines d'enveloppe.

Les « **virus-like** » **particules (VLP)**, définies comme des particules composées des protéines C, E1 et E2 du VHC s'assemblant de manière autonome dans des cellules d'insectes ou de mammifères, présentent des propriétés morphologiques, biophysiques et antigéniques semblables à celles de virions isolés de patients (Baumert et al. 1998). La conformation des hétérodimères E1E2 des VLP proche de celle des virions natifs et leur capacité à s'attacher et à entrer dans les lignées hépatocytaires, les hépatocytes humains primaires et les cellules dendritiques, en font un modèle intéressant pour étudier les mécanismes d'interaction entre le virus et les cellules hôtes (Triyatni et al. 2002; Wellnitz et al. 2002; Barth et al. 2005; Barth et al. 2005). De plus, les VLP présentant des propriétés antigéniques semblables à celle du virus sauvage, elles ont été proposées en tant que vaccin potentiel (Baumert et al. 1999; Steinmann et al. 2004). Cependant, comme ces particules ne comportent pas de génome viral ou de gène rapporteur, l'étude des mécanismes d'attachement et d'entrée nécessite l'utilisation de techniques de microscopie ou de cytométrie en flux.

Les **pseudo-particules rétrovirales du VHC (VHCpp)** constituent le premier système robuste et flexible ayant permis d'étudier toutes les fonctions virales dépendantes des glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2. Ce sont des virus chimères obtenus par incorporation des glycoprotéines E1 et E2, sous leur forme native, à la surface de particules rétrovirales ou lentivirales. Les VHCpp sont générées en transfectant des cellules embryonnaires de rein humain (cellules HEK 293T) avec trois vecteurs d'expression. Le premier vecteur code la protéine de capsid d'un rétrovirus (virus de la leucémie murine (MLV)) ou un lentivirus (virus de l'immunodéficience humaine (VIH)), le deuxième exprime les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 du VHC natives et le troisième vecteur code un génome rétroviral défectif comportant uniquement le LTR (long terminal repeat) et le signal d'encapsidation et codant un gène marqueur de transfert GFP (Green Fluorescent Protein), beta-galactosidase ou luciférase (Bartosch et al. 2003; Hsu et al. 2003) permettant la détection des cellules infectées par criblage à

haut débit (Figure 3). Les VHCpp sont considérées comme l'outil de référence pour étudier les propriétés des glycoprotéines E1E2. Les VHCpp infectent certaines lignées cellulaires hépatocytaires, en particulier les Huh7 et dérivés, et les hépatocytes primaires humains (Bartosch et al. 2003). Ce modèle a permis d'identifier deux co-récepteur du VHC : les protéines de jonction claudine 1 (CLDN1) et occludine (OCLN) (Evans et al. 2007; Ploss et al. 2009). Les VHCpp permettent également d'étudier les anticorps neutralisants et de caractériser les mécanismes moléculaires du processus de neutralisation *in vitro* et *in vivo* (Bartosch et al. 2003; Meunier et al. 2005; Pestka et al. 2007; von Hahn et al. 2007; Law et al. 2008; Vanwollegem et al. 2008). En effet, les VHCpp miment étroitement l'entrée du virus dans la cellule et possèdent des propriétés antigéniques similaires à celles du VHC natif.



**Figure 3: Production des pseudo-particules rétrovirales du VHC (VHCpp).** Les VHCpp sont des virus chimères infectieux obtenus par incorporation des glycoprotéines E1 et E2, sous leur forme native, à la surface de particules rétrovirales. Les VHCpp sont générées en transfectant des cellules embryonnaires de rein humain avec des vecteurs d'expression codant la polyprotéine entière E1E2, la protéine de capsid d'un rétrovirus/lentivirus et un génome rétroviral défectif portant un gène marqueur de transfert qui permettra d'évaluer le pouvoir infectieux des VHCpp. Les VHCpp infectent certaines lignées hépatocytaires, en particulier les Huh7, et les hépatocytes humains primaires. LTR - long terminal repeat; PBS - primer binding site; PPT - polypurine tract;  $\Psi$  - séquence d'encapsulation.

Les **réplicons subgénomiques** du VHC ont rendu possible l'étude de la réplication virale du VHC (Lohmann et al. 1999). Ces ARN réplcatifs autonomes bicistroniques contiennent : (i) en 5' l'IRES du VHC qui assure la traduction d'un gène de résistance antibiotique (néomycine), (ii) l'IRES du virus de l'encéphalomyocardite (VEMC) assurant la traduction des protéines non-structurales (NS3 à NS5B), (iii) le tout encadré par les régions 5' et

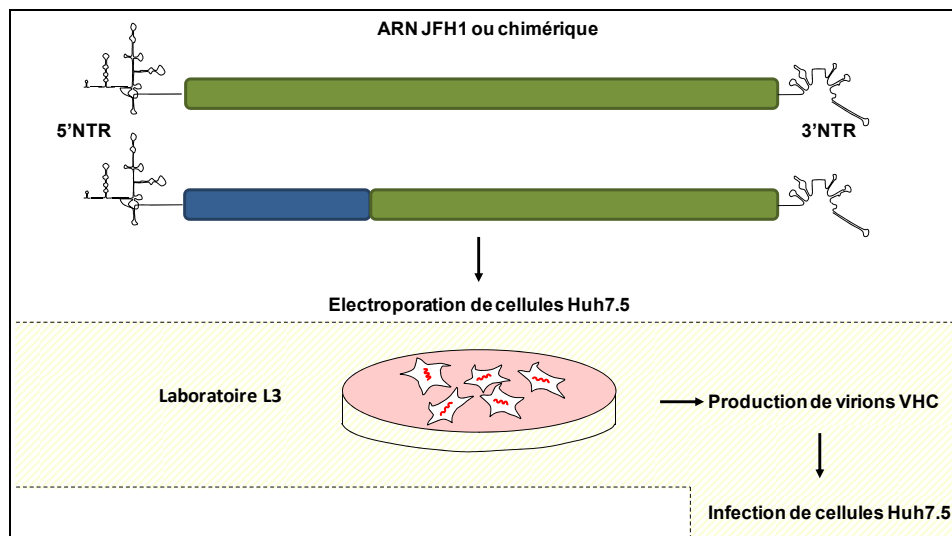
3'NTR du VHC. Seuls les clones résistants à la néomycine répliquent l'ARN du VHC (Lohmann et al. 1999). Le système de réplicon a été d'un grand apport dans l'étude de la réplication du VHC et de certaines interactions virus-hôtes. Ils ont été aussi couramment utilisés pour la validation de drogues antivirales ciblant des enzymes du VHC.

La culture cellulaire des réplicons conduit à l'apparition de mutations adaptatives dans le virus, principalement dans les régions NS3, NS4B et NS5A (Bartenschlager et al. 2004), qui augmentent significativement le taux de réplication des cellules transfectées (Lohmann et al. 2001). Plusieurs de ces mutations modifient l'état de phosphorylation de NS5A dont la forme hyperphosphorylée est délétère pour la réplication efficace de VHC (Evans et al. 2004). Ainsi, les réplicons génomiques contenant la séquence complète du virus, bien que se répliquant efficacement en culture cellulaire sous pression de sélection antibiotique, n'ont pas permis la production de particules virales infectieuses (Pietschmann et al. 2002).

Plus récemment, en 2005, trois laboratoires ont réussi à produire des **particules virales recombinantes** infectieuses **VHC produites en culture cellulaire (VHCcc)** (Lindenbach et al. 2005; Wakita et al. 2005; Zhong et al. 2005). Celles-ci sont produites à partir d'un clone unique capable de se répliquer en culture cellulaire sans nécessiter de mutations adaptatives. Ce clone correspond à un variant de génotype 2a, dénommé JFH-1 (Japanese fulminant hepatitis), isolé chez un patient japonais qui a développé une hépatite C fulminante (Wakita et al. 2005). Le modèle des VHCcc est basé sur la transfection de cellules Huh7 avec l'ARN de JFH1. Les particules virales produites et secrétées dans le milieu de culture sont ensuite capables d'infecter des cellules Huh7 naïves (Figure 4). Les VHCcc sont également capables d'infecter les chimpanzés et les souris SCID transplantées avec des hépatocytes humains (Lindenbach et al. 2005; Wakita et al. 2005; Zhong et al. 2005). La production de VHCcc de génotypes différents est aussi possible par l'utilisation de virus chimères intra-génotypiques (Lindenbach et al. 2005; Pietschmann et al. 2006) ou inter-génotypiques (Pietschmann et al. 2006) (Figure 4). De plus, des virus exprimant un gène rapporteur (luciférase ou GFP/RFP) ont également été produits afin de faciliter la détection des cellules infectées (Koutsoudakis et al. 2006; Schaller et al. 2007; Tscherne et al. 2007). Le modèle des VHCcc a permis des avancées majeures dans la recherche sur le VHC car il permet l'étude du cycle viral complet. De plus, ce modèle a permis de confirmer les résultats obtenus ultérieurement avec d'autres modèles d'étude. En effet, il a permis



de confirmer le rôle des glycoprotéines d'enveloppe dans l'entrée du virus (Wakita et al. 2005), le tropisme préférentiel pour les cellules hépatiques (Lindenbach et al. 2005; Wakita et al. 2005; Zhong et al. 2005), le rôle des récepteurs impliqués dans l'entrée du virus (Lindenbach et al. 2005; Wakita et al. 2005; Zhong et al. 2005; Koutsoudakis et al. 2006; Zeisel et al. 2007) et l'activité des anticorps neutralisants (Haberstroh et al. 2008; Zeisel et al. 2008). Ce modèle a également permis de progresser dans l'étude d'autres étapes du cycle du VHC, inexplorés jusqu'à présent, telles que l'assemblage et la sécrétion des particules virales infectieuses (Chang et al. 2007; Gastaminza et al. 2008; Benga et al. 2010). Cependant, le système VHCcc nécessitant une manipulation en confinement L3, il reste un système moins facile à utiliser que les VHCpp.



**Figure 4 : Production de particules virales VHC produites en culture cellulaire (VHCcc).** Les VHCcc sont obtenus par électroporation de cellules Huh7.5 par l'ARN de JFH1 ou un ARN chimérique. Le cadre vert représente l'ARN de JFH1. Le cadre bleu représente la partie core-E1-E1-NS2 de génotypes différents.

## ii. Les modèles animaux

L'étude de l'infection VHC *in vivo* a été effectuée pendant 20 ans sur le **chimpanzé** (*Pan troglodyte*). Les données obtenues ont largement contribué à la compréhension de la pathogenèse du VHC. L'infection par le virus suit une progression quasiment identique à celle observée chez l'homme. En effet l'ARN viral est détectable dans le sang quelques jours après l'infection, suivie par une hépatite aigüe caractérisée par une augmentation des ALAT et par le développement d'une réponse immunitaire adaptée. De plus, comme chez le patient infecté, l'infection chronique est associée à des lésions histologiques et à un risque de CHC (Bradley 2000). Néanmoins, le

modèle du chimpanzé présente plusieurs inconvénients : l'infection chronique est moins sévère que chez l'humain, il est très coûteux, il est de manipulation délicate car il nécessite une infrastructure spécialisée, et depuis 1988 le chimpanzé a été classé comme animal en voie d'extinction. Pour toutes ces raisons, le développement de nouveaux modèles animaux était nécessaire.

Grâce au développement de souris transgéniques et la possibilité de transplanter ces souris avec des hépatocytes humains, le modèle du chimpanzé a été progressivement abandonné (Barth et al. 2008). La découverte d'un phénotype « hépatocyte-léthal » chez des souris transgéniques portant le transgène « urokinase-type plasminogen activator » (Alb-uPA) et le croisement de ces souris avec des souris immunodéficientes permettant la reconstitution complète du foie de ces souris par xenogreffe d'hépatocytes humains a permis le développement d'un petit modèle animal pour l'étude des hépatites B et C. En 2001, Mercer et collaborateurs ont montré pour la première fois que des **souris SCID (severe combined immunodeficiency disorder)/Alb-uPA** transplantées avec des hépatocytes humains pouvaient être infectées par le VHC *in vivo* (Mercer et al. 2001). La mesure du taux d'albumine permet d'évaluer l'intégrité et la fonctionnalité des hépatocytes humains transplantés. Une fois stabilisées, les souris SCID/Alb-uPA peuvent être infectées soit par le sérum de patients ou de chimpanzés infectés par le VHC, soit par des VHCcc (Mercer et al. 2001; Law et al. 2008; Vanwolleghem et al. 2008). Les charges virales du VHC mesurées dans le sérum de ces souris sont comparables à celles observées chez l'homme. De plus, le plasma dérivé de ces souris est capable d'infecter d'autres souris permettant ainsi une infection en série. L'infection par le VHC dans ce modèle peut être maintenue durant au moins 4 mois. Pendant cette période, la fonction et l'architecture du foie ne sont pas altérées (Barth et al. 2008). Le modèle des souris SCID/Alb-uPa SCID a permis de confirmer le rôle des anticorps anti-récepteurs ainsi que des anticorps neutralisants dans le contrôle de l'infection virale (Law et al. 2008; Meuleman et al. 2008; Vanwolleghem et al. 2008). Ce modèle murin présente l'avantage d'être moins cher, d'entretien plus facile et de reproduction plus rapide que le chimpanzé. Néanmoins, l'utilisation de ce modèle animal murin est très difficile à mettre en place. Il nécessite une grande expertise pour isoler et transplanter les hépatocytes humains et maintenir les colonies de souris très fragiles à cause de leur immunodépression. Le taux de mortalité des nouveau-nés est estimé à environ 35% (Mercer et al. 2001). De plus, les interactions virus-hôte sont limitées par le fond génétique murin de ces souris.

## C. Le cycle viral

### i. Les multiples facteurs d'entrée

Le VHC a un tropisme principalement hépatocytaire et sa réplication dans ces cellules a été démontrée *in vivo* et *in vitro*. L'attachement et l'entrée du VHC dans la cellule hôte est complexe et se déroule en plusieurs étapes. Par l'utilisation des différents modèles *in vitro* décrits précédemment, plusieurs molécules de surface interagissant avec le VHC ont pu être identifiées telles que la tétraspanine CD81 (Pileri et al. 1998), le récepteur des lipoprotéines de faible densité (LDL-R) (Agnello et al. 1999), les glycosaminoglycanes (GAG) héparanes sulfates (HS) (Barth et al. 2003), le scavenger récepteur BI (SR-BI) (Scarselli et al. 2002), les lectines de type C (DC-SIGN/L-SIGN) (Pohlmann et al. 2003; Lozach et al. 2004), claudine 1 (CLDN1) (Evans et al. 2007) et plus récemment occludine (OCLN) (Ploss et al. 2009).

*In vivo*, le VHC arrive au foie par voie sanguine. La capture des particules virales infectieuses par les cellules endothéliales et macrophages du foie (cellules de Kupffer) pourrait faciliter l'infection des hépatocytes adjacents qui ne sont pas en contact direct avec le sang circulant. Ce processus pourrait être médié par les **lectines de type C** telles que les DC-SIGN, exprimés sur les cellules de Kupffer qui sont elles-mêmes localisées à proximité des cellules endothéliales sinusoidales du foie et des hépatocytes (van Kooyk et al. 2003), et les L-SIGN qui sont fortement exprimés au niveau des cellules endothéliales sinusoidales du foie. En effet, il a été montré que les DC-SIGN et les L-SIGN sont capables de reconnaître des structures glycanes (Koppel et al. 2005). Par co-culture de cellules Huh7 et de cellules Hela exprimant DC-SIGN et L-SIGN, il a été montré que la liaison de E2 à L-SIGN pouvait induire la transmission de VHCpp à des cellules hépatiques adjacentes (Cormier et al. 2004). Cependant, ces molécules ne permettent pas par elles-mêmes l'entrée des VHCpp et des VHCcc (Lai et al. 2006). Ces molécules pourraient ainsi contribuer à l'établissement de l'infection persistante en concentrant le virus à la proximité des hépatocytes (Cormier et al. 2004).

Au niveau des hépatocytes, les **glycosaminoglycanes (GAGs)** hautement sulfatés comme les **héparanes sulfates (HS)** représentent le premier site d'attachement du VHC (Barth et al. 2003; Barth et al. 2006). Les GAGs sont des sites de liaison pour de nombreux virus. Il a été

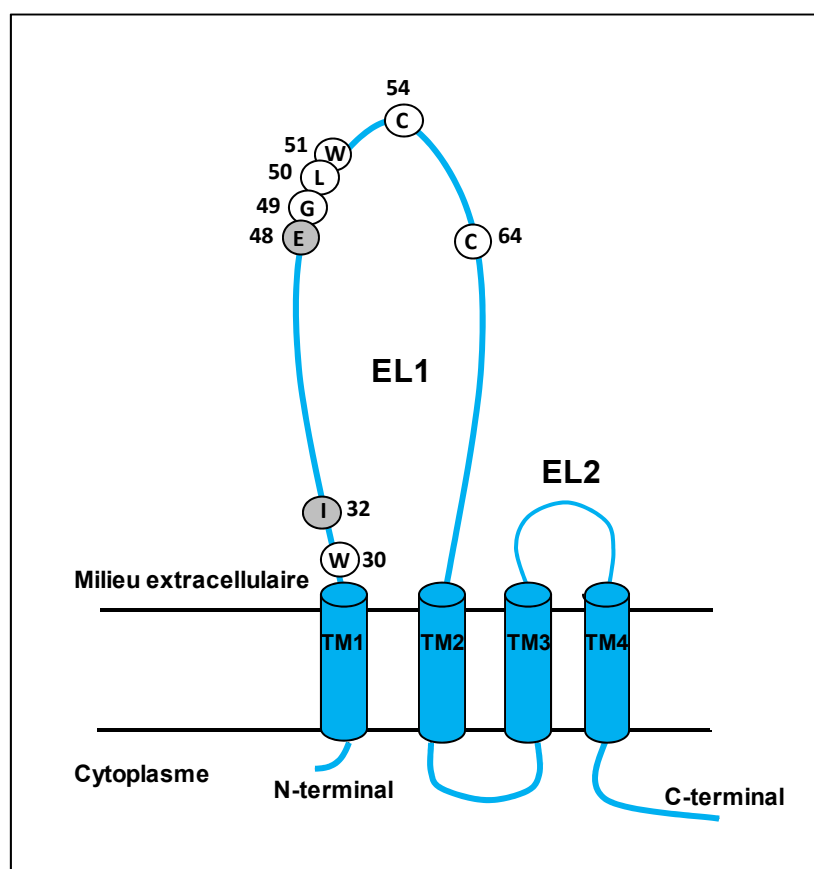
démontré que les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 interagissent avec les HS (Barth et al. 2006). De plus, l'utilisation d'héparine, un analogue de l'héparane sulfate, ou d'héparinase, une enzyme dégradant les héparanes sulfates, inhibe l'attachement du VHC aux cellules. De même, le traitement des cellules avec des glycosidases réduit l'infectiosité du virus (Barth et al. 2006) démontrant le rôle important des HS dans la liaison au VHC. Les HS pourraient ainsi contribuer à l'infection en concentrant le virus à la surface de la cellule cible et permettre les interactions avec les autres facteurs de l'hôte responsables de l'entrée virale.

La **tétraspamine CD81** a été le premier récepteur d'entrée du VHC identifié (Pileri et al. 1998) comme interagissant avec la forme soluble de E2 (sE2) et est un facteur cellulaire de l'hôte essentiel pour l'entrée virale (McKeating et al. 2004; Lavillette et al. 2005; Lindenbach et al. 2005). CD81 est une tétraspamine de 25 kDa exprimée de manière ubiquitaire, composée de quatre domaines transmembranaires, de deux boucles extracellulaires SEL et LEL (small and large extracellulaire loop), d'une petite boucle intracellulaire et de deux extrémités N- et C-terminales. Des anticorps anti-CD81 ainsi que des formes solubles de la boucle extracellulaire LEL de CD81 (sCD81-LEL) peuvent inhiber l'entrée et l'infection par les VHCpp et les VHCcc dans les cellules Huh7 et les hépatocytes, démontrant le rôle de la LEL de CD81 dans l'entrée du VHC (McKeating et al. 2004; Zhang et al. 2004; Zhong et al. 2005). De nombreux résidus acides aminés ont été identifiés comme essentiels à l'interaction entre E2 et CD81-LEL (Pileri et al. 1998; Flint et al. 1999; Patel et al. 2000; Owsianka et al. 2001; Bertaux et al. 2006). L'utilisation de VHCpp et de VHCcc a montré l'importance des résidus acides aminés aux positions 415, 420, 527, 529, 530, 535 de la glycoprotéine E2 pour l'interaction VHC-CD81 (Owsianka et al. 2006; Dhillon et al. 2010). Enfin, une corrélation a été montrée entre le niveau d'expression de CD81 au niveau des cellules hépatocytaires et le niveau d'infection par le VHC (Koutsoudakis et al. 2006; Akazawa et al. 2007) suggérant un lien entre la densité d'expression de CD81 au niveau de la surface cellulaire et le niveau d'infection. Cependant, la répartition ubiquitaire de CD81 ne permet pas d'expliquer le tropisme restreint du VHC (Levy et al. 1998). De plus, la capacité d'anticorps anti-CD81 à inhiber l'entrée de VHCpp et l'infection de VHCcc à un stade post-attachement (Cormier et al. 2004; Koutsoudakis et al. 2006) suggère que CD81 joue un rôle de co-facteur dans l'entrée virale.

Le **scavenger récepteur BI (SR-BI) ou CLA1 (CD36 and LIMPII Analogous-1)** a été identifié comme co-facteur du VHC en utilisant des glycoprotéines E2 immobilisées sur des colonnes d'affinité (Scarselli et al. 2002). SR-BI est une glycoprotéine de 82 kDa, fortement exprimée au niveau du foie et des tissus stéroïdogènes (ovaires et glandes surrénales) (Krieger 2001) ainsi qu'au niveau des cellules dendritiques dérivées de monocytes et composée d'une grande boucle extracellulaire et de deux courts domaines intracellulaires. La fonction première de SR-BI est de lier une grande variété de lipoprotéines (HDL, LDL et LDL oxydé) et il est impliqué dans le transport bidirectionnel du cholestérol à la membrane cellulaire: il facilite l'entrée sélective du cholestérol estérifié des HDL dans la cellule et régule le flux sortant du cholestérol cellulaire. L'utilisation de siARN inhibant l'expression de SR-BI et d'anticorps anti-SR-BI pouvant bloquer l'infection des cellules par les VHCpp et les VHCcc ont confirmé l'importance de SR-BI dans l'entrée virale (Bartosch et al. 2003; Voisset et al. 2005; Zeisel et al. 2007). La surexpression de SR-BI permet d'augmenter l'infection par les VHCpp et les VHCcc (Grove et al. 2008; Schwarz et al. 2009). Il a été montré que la région HVR1 de la glycoprotéine E2 interagit avec le domaine extracellulaire de SR-BI (Scarselli et al. 2002; Barth et al. 2005). En utilisant des VHCcc, le groupe de Nicosia a identifié les résidus spécifiques de SR-BI nécessaires pour la reconnaissance et l'attachement de la glycoprotéine d'enveloppe E2: il s'agit des acides aminés 70 à 87 et le résidu E210 (Catanese et al. 2010). SR-BI jouerait un rôle à la fois lors de l'attachement et lors de stades post-attachement (Zeisel et al. 2007; Catanese et al. 2010). Les ligands physiologiques de SR-BI modulent l'infection par le VHC: les HDL augmentent l'infection par les VHCpp et les VHCcc (Bartosch et al. 2005; Voisset et al. 2005) et la forme oxydée des LDL inhibent l'infection par les VHCpp et les VHCcc (von Hahn et al. 2006). De plus, il a été montré, par l'utilisation de sérum dérivé de patients infectés par le VHC, que le virus associé aux lipoprotéines, plutôt que la protéine E2, interagit avec SR-BI exprimé sur des cellules ovariennes d'hamsters (CHO) (Maillard et al. 2006). Toutes ces données suggèrent la duplicité de SR-BI, à lier d'une part les HDL et d'autre part les particules virales du VHC.

Les récepteurs décrits précédemment n'expliquaient pas le tropisme restreint du VHC. Récemment, par clonage d'expression, la protéine de jonction **claudine 1 (CLDN1)** a été identifiée comme étant un facteur d'entrée critique dans les hépatocytes (Evans et al. 2007). 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 qui régulent la perméabilité paracellulaire et maintiennent la polarité cellulaire dans les épithéliums et les endothéliums (Van Itallie et al. 2006). Les jonctions serrées sont formées d'au moins 40 protéines différentes, incluant les CLDNs, l'occludine (OCLN) et les junctional adhesion molecules (JAMs) ainsi que d'autres protéines intracellulaires associées, nommées protéines d'ancrage et de polarité (ZO-1, ZO-2 et ZO-3). Ces protéines forment une plateforme d'ancrage pour le cytosquelette d'actine et les protéines impliquées dans la polarité (Chiba et al. 2008). La distribution de CLDN1 au niveau des jonctions serrées est corrélée à la permissivité de l'infection par le VHC. Les CLDNs contiennent quatre domaines transmembranaires, deux boucles extracellulaires (EL1 et EL2) et deux extrémités N- et C-terminales intracellulaires (Figure 5).



**Figure 5: Représentation schématique de CLDN1.** Le motif W(30)-GLW(51)-C(54)-C(64), très conservé à travers les CLDNs, ainsi que les résidus I32 et E48 sont importants pour l'entrée.

CLDN1 est exprimée au niveau des tissus épithéliaux , et principalement dans le foie (Furuse et al. 1998). CLDN1 est localisée au niveau des jonctions serrées des hépatocytes, au niveau de la région canaliculaire, mais aussi au niveau des régions sinusoidales basolatérales de ces cellules (Reynolds et al. 2008). L'expression de la protéine CLDN1 dans des cellules non permissives au VHC telles les 293T les rendent permissives à l'infection par les VHCpp (Evans et al. 2007). La surexpression de CLDN1, contrairement à celle de SR-BI, n'augmente pas l'infectivité (Schwarz et al. 2009). CLDN1 est impliquée dans l'entrée du virus, dans une étape post-attachement (Evans et al. 2007; Krieger et al. 2010). Jusqu'à ce jour, aucune équipe n'a montré d'interaction directe entre les glycoprotéines d'enveloppe E1E2 et le récepteur CLDN1. Cependant, il a été montré que la boucle EL1, et particulièrement un motif structural très conservé à travers les CLDNs W(30)-GLW(51)-C(54)-C(64), est important pour l'entrée du VHC, ainsi que les résidus I32 et E48 (Evans et al. 2007; Cukierman et al. 2009) (Figure 5). De plus, des études ont montré que CLDN1 et CD81 co-localisent au niveau des régions apicale et basolatérale des cellules hépatocytaires et des hépatocytes (Reynolds et al. 2008; Mee et al. 2009). CLDN1 s'associe à CD81 et la formation du complexe CLDN1-CD81 est essentielle pour l'infection par le VHC (Harris et al. 2008; Harris et al. 2010). Des mutations au niveau des résidus 32 et 48 au niveau d'EL1 de CLDN1 dissocie l'interaction avec CD81 et entraîne l'arrêt de l'activité virale du récepteur (Harris et al. 2010). Toutefois, la surexpression de CLDN1 dans des lignées hépatocytaires, telle que les H1H et les NKNT3 qui expriment CD81, ne suffit pas à rendre ces cellules permissives à l'infection par le VHC (Meertens et al. 2008). Ces résultats suggèrent que d'autres facteurs cellulaires sont requis pour l'entrée du VHC dans les cellules cibles.

Par ailleurs, deux équipes ont montré que CLDN6 et CLDN9 semblent être impliquées dans l'entrée du VHC dans la cellule hôte (Zheng et al. 2007) étant donné que la surexpression de ces deux CDLNs dans des lignées cellulaires 293T entraîne l'entrée des VHCpp (Meertens et al. 2008). Cependant l'expression de CLDN6 et CLDN9 n'a pas encore pu être confirmée sur les lignées hépatocytaires et sur les hépatocytes humains (Meertens et al. 2008).

Plus récemment, une autre protéine de jonction, **occludine (OCLN)**, a été identifiée comme étant un autre facteur cellulaire de l'hôte essentiel pour l'entrée du VHC, probablement à un stade post-attachement (Ploss et al. 2009). OCLN est une protéine de 65 kDa, contenant deux extrémités N- et C-terminales intracytoplasmiques, quatre domaines transmembranaires et deux

boucles extracellulaires de même taille (EL1 et EL2). Jusqu'à ce jour, il n'y a pas de preuve d'une interaction directe entre OCLN et le VHC. En surexprimant différentes combinaisons des quatre co-facteurs CD81, SR-BI, CLDN1 et OCLN murins et humains dans des lignées de hamster ou de souris (cellules CHO et NIH3T3), il a été montré que les récepteurs humains CD81 et OCLN rendent les cellules murines infectables par les VHCpp (Ploss et al. 2009), démontrant que OCLN, tout comme CD81, est un des facteurs responsable de la spécificité d'espèce du VHC. Les acides aminés déterminant cette spécificité d'espèce sont retrouvés dans la seconde boucle extracellulaire de OCLN (Ploss et al. 2009). Cette nouvelle découverte ouvre, de plus, la voie à l'utilisation d'un modèle murin pour l'étude du VHC. Toutefois, d'autres expériences seront nécessaires pour élucider l'interaction entre le VHC, OCLN et les autres facteurs de l'hôte.

Etant donné que le VHC circule dans le sang associé aux LDL et aux VLDL (very-low density lipoproteins), le **récepteur aux LDL (LDL-R)** a aussi été proposé comme un facteur d'attachement et/ou d'entrée du VHC (Agnello et al. 1999; Wunschmann et al. 2000). Cependant, étant donné que les VHCpp ne sont pas associées aux lipoprotéines, les études sur l'interaction entre le LDL-R et les VHCpp n'ont pas pu aboutir à des résultats concluant sur le rôle de ce facteur cellulaire dans l'entrée du VHC (Bartosch et al. 2003). De plus, aucune interaction directe entre la glycoprotéine d'enveloppe E2 ou les LDL et le LDL-R n'a pu être démontrée (Wunschmann et al. 2000). Cependant, le LDL-R entraîne l'internalisation du VHC provenant de sérums de patients infectés, dans lesquels les particules virales sont souvent associées aux LDL ou aux VLDL, dans des cellules hépatocytaires HepG2 n'exprimant pas CD81 (Agnello et al. 1999). En conclusion, tout comme SR-BI, le LDL-R pourrait participer à l'entrée du VHC via les lipoprotéines associées au VHC.

## ii. L'entrée du virus : un processus multifactoriel

*In vivo*, le VHC, provenant de la circulation sanguine et associé aux lipoprotéines, s'attache de manière non spécifique aux GAGs héparanes sulfates (Barth et al. 2003; Barth et al. 2006) avant d'interagir avec plusieurs facteurs d'entrée : SR-BI (Scarselli et al. 2002; Bartosch et al. 2003; Zeisel et al. 2007), CD81 (Pileri et al. 1998; Koutsoudakis et al. 2006), CDLN1 (Evans et al. 2004; Krieger et al. 2010) et OCLN (Yang et al. 2008; Liu et al. 2009; Ploss et al. 2009)



(Figure 6). Tous ces facteurs sont importants et nécessaires pour une infection persistante du VHC. Ceci suggère que l'entrée se fait grâce à des interactions ou des complexes bien structurés entre le VHC et les différents facteurs d'entrée au niveau de la membrane plasmique (Zeisel et al. 2007; Krieger et al. 2010). La formation de tels complexes entre les facteurs d'entrée a été démontrée par FRET (fluorescence resonance energy transfer). En effet, CLDN1 et CD81 s'associent en complexe, la formation de ce complexe étant essentielle pour l'infection par le VHC (Harris et al. 2008; Harris et al. 2010). A ce jour, la formation d'autres complexes est mal connue. Des premières études ont montré que la majorité des protéines CLDN1 de la membrane plasmique interagissent avec OCLN, mais il n'existe aucune preuve d'une relation causale entre la formation d'un complexe CLDN1-OCLN et l'infection par le VHC (Harris et al. 2010). De plus, il a été montré que le contact entre cellules module les niveaux d'expression de SR-BI et de CLDN1 favorisant l'internalisation du virus (Schwarz et al. 2009). Suite à l'interaction du VHC avec les différents facteurs de l'hôte, il a été montré que l'entrée du VHC dans les lignées hépatocytaires et dans les hépatocytes se fait par endocytose via les puits à clathrine (voie clathrine-dépendante) (Blanchard et al. 2006; Codran et al. 2006). Une fois internalisé, les virus en général, ainsi que les récepteurs, sont dirigés vers les endosomes précoces, puis tardifs (Marsh et al. 2006). En ce qui concerne le VHC, il n'est pas connu si toute ou une partie de la membrane exprimant les facteurs de l'hôte est internalisée en même temps que le VHC. Cependant une étude récente suggère que lors de l'internalisation, le VHC s'associe à CD81 et CLDN1 (Coller et al. 2009) Sous l'effet de l'acidification du pH dans les endosomes précoces, les membranes du VHC fusionnent avec les membranes de l'endosome pour libérer l'ARN génomique viral dans le cytosol. Ceci est en accord avec des études récentes montrant la co-localisation entre le VHC et Rab5a qui est un marqueur des endosomes précoces (Coller et al. 2009); mais aussi par le fait que l'entrée de VHCpp (Bartosch et al. 2003; Lavillette et al. 2006) et l'infection de VHCcc se fait de manière pH-dépendante (Blanchard et al. 2006; Tscherne et al. 2006). Plusieurs laboratoires proposent que le processus de fusion induit des changements de conformation des protéines d'enveloppe E1 E2 (Bartosch et al. 2003; Blanchard et al. 2006; Koutsoudakis et al. 2006; Meertens et al. 2006; Tscherne et al. 2006). Il existe deux grandes classes de protéines de fusion : (i) les protéines de fusion de classe I (telles l'hémagglutinine du virus de la grippe ou la gp41 du VIH) qui sont synthétisées sous forme d'un précurseur clivé par les protéases cellulaires libérant le peptide fusogène N-terminal qui va s'ancrer dans la membrane cellulaire et (ii) les protéines de

fusion de classe II (telles chez les *Flaviridae*) qui possèdent un peptide de fusion interne et qui sont synthétisées sous forme d'un complexe, dont une agit comme chaperonne de l'autre (Sollner 2004). L'activation du pouvoir fusogène de la protéine de fusion fait suite au clivage de la protéine chaperonne de l'autre. Dans le cas du VHC, on pense que les glycoprotéines d'enveloppe ont un mode de repliement semblable à celui des protéines de fusion de classe II, étant donné son appartenance à la famille des *Flaviridae*. La fusion est induite par un mécanisme pH dépendant. Dans le cas du VHC, le rôle précis des glycoprotéines d'enveloppe E1 E2 dans cette étape de fusion n'est pas encore bien défini. Les deux glycoprotéines E1 et E2 ont l'une pour l'autre une activité chaperonne (Lavie et al. 2007) et semblent intervenir toutes les deux dans le processus de fusion (Lavillette et al. 2007). De manière intéressante, par des études de fusion cellulaire, où les glycoprotéines d'enveloppe sont exprimées sur un type cellulaire et les facteurs de l'hôte sur un autre type cellulaire (Kobayashi et al. 2006), il a pu être montré un rôle des récepteurs CD81 et CLDN1 dans le processus de fusion (Kobayashi et al. 2006; Evans et al. 2007). Mais il n'est pas bien défini si les facteurs de l'hôte participent directement dans le processus de fusion du VHC ou s'ils jouent seulement un rôle dans des étapes précoces nécessaires à ce processus. Cependant, toutes ces données suggèrent que les étapes d'entrée et de fusion représentent des cibles intéressantes pour le développement d'inhibiteurs d'entrée dirigés contre le VHC.

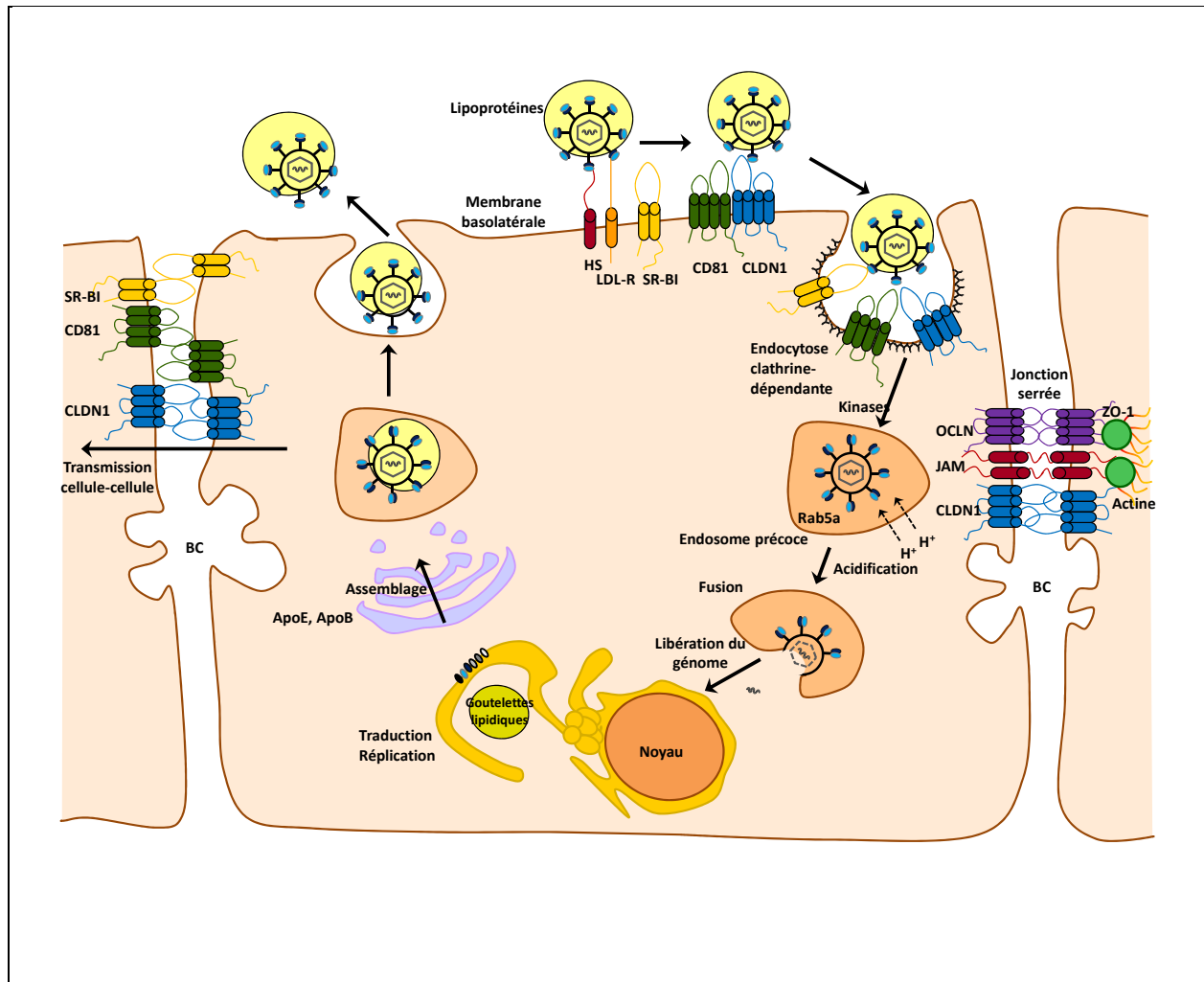
Suite à la libération de l'ARN génomique dans le cytoplasme, la réplication des brins d'ARN de polarité positive peut débuter avec la synthèse d'un brin d'ARN complémentaire de polarité négative qui sert de matrice pour la production des brins d'ARN de polarité positive.

Les VHCcc ont permis d'étudier les étapes tardives du cycle répliatif, telles que l'assemblage des particules et la libération des virions. L'assemblage des particules virales à l'interface du RE et des organelles de stockage des matières grasses appelées « gouttelettes lipidiques » est déclenchée par l'association des protéines C aux lipides (Miyanari et al. 2007). La co-localisation du complexe de réplication avec les protéines d'enveloppe E1 et E2 du VHC facilite la production des virus infectieux. C'est dans le RE que les protéines d'enveloppe E1 et E2 vont subir différentes modifications post-traductionnelles dont la N-glycosylation (Goffard et al. 2005). Les glycanes associées jouent un rôle majeure dans le repliement, mais aussi dans les fonctions d'entrée du virus et dans la modulation de la réponse immunitaire (Lavie et al. 2007).

En effet, 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'entrée des VHCpp et VHCcc (Falkowska et al. 2007; Helle et al. 2007). De plus, les glycanes associées à E2 masquent des domaines fonctionnels importants pour l'accessibilité des anticorps neutralisants (Falkowska et al. 2007; Helle et al. 2007).

Les virions néosynthétisés sont ensuite libérés dans la lumière du RE et relargués à l'extérieur de la cellule par la voie de sécrétion des VLDL (Huang et al. 2007; Gastaminza et al. 2008). Les particules virales produites provenant des cellules infectieuses peuvent à ce moment infecter des cellules naïves via une voie dépendante des récepteurs.

Il a récemment été montré *in vitro* que le VHC pouvait être transmis de cellules à cellules (Timpe et al. 2008) et ainsi échapper à l'action des anticorps neutralisants présents dans le milieu extracellulaire. Les récepteurs cellulaires SR-BI, CD81 et CLDN1 semblent être impliqués dans ce mode de transmission (Timpe et al. 2008; Schwarz et al. 2009) bien que, en ce qui concerne le récepteur CD81, il a pu être montré l'existence de mode(s) de transmissions cellule à cellule indépendant(s) de ce facteur (Timpe et al. 2008; Witteveldt et al. 2009) (Figure 6). Ce mode de transmission a un impact direct sur le développement des antiviraux, étant donné que ce processus de transmission permet l'échappement aux anticorps neutralisants présents dans le milieu extracellulaire et à ceux interférant avec les facteurs de l'hôte.

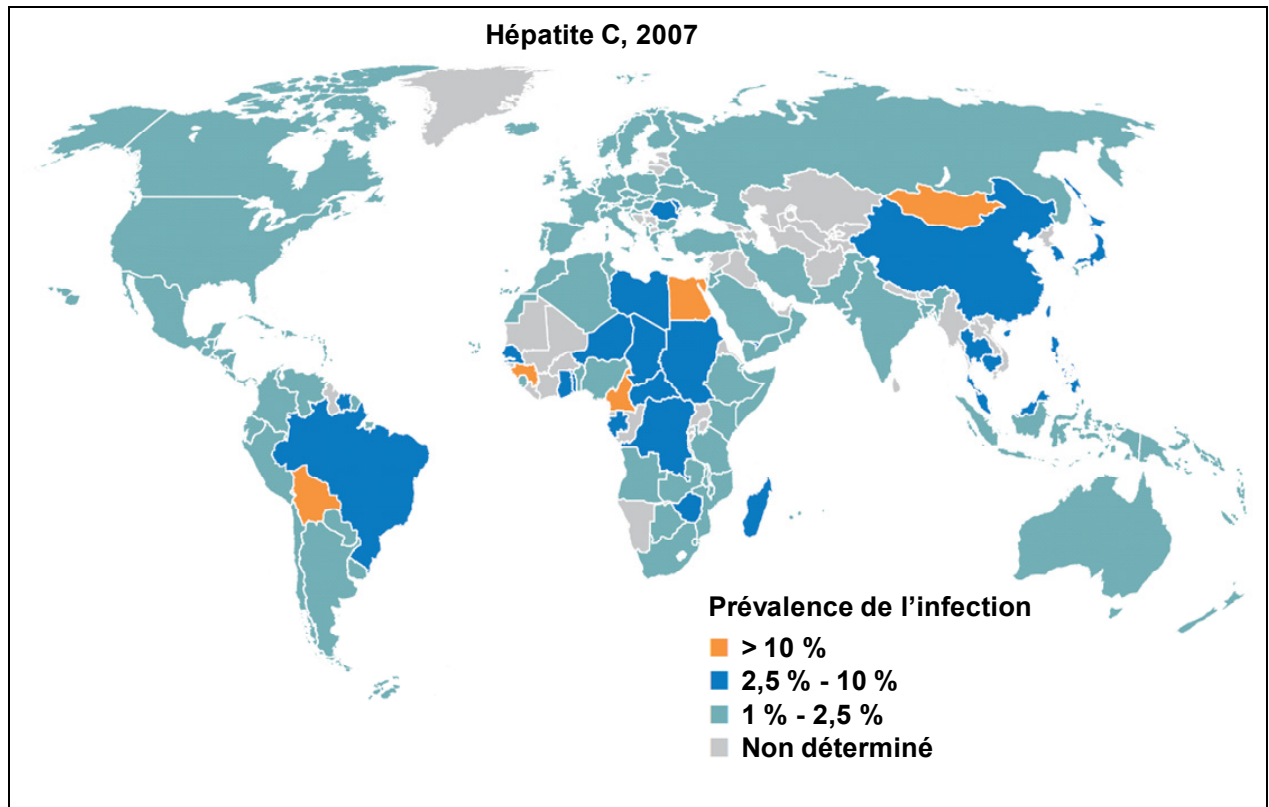


**Figure 6: Entrée du VHC dans les hépatocytes.** Le VHC interagit avec les HS et le récepteur au LDL (LDL-R) au niveau la membrane basolatérale des hépatocytes. Suite à l'interaction avec les différents facteurs de l'hôte tels SR-BI, CD81, CLDN1 et OCLN, le virion est internalisé via le processus d'endocytose par voie clathrine-dépendante. La fusion entre les membranes du virus et de l'endosome entraîne la libération de l'ARN génomique dans le cytoplasme où la traduction et la réplication ont lieu. Les particules VHC sont ensuite assemblées et sécrétées hors de la cellule hôte. La transmission de cellule à cellule représente un mode alternatif d'infection des hépatocytes par le VHC permettant l'échappement aux anticorps neutralisants présents dans le milieu extracellulaire. BC - bile canaliculi.

## **D. L'hépatite C : la maladie**

### **i. Epidémiologie, manifestations cliniques et traitement**

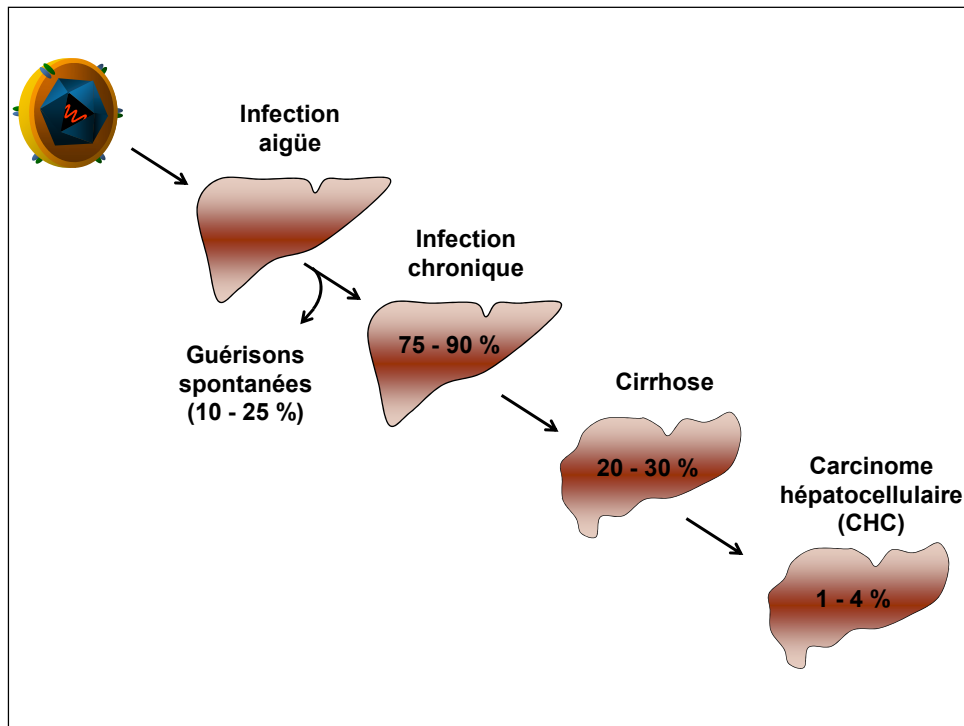
L'infection par le VHC est une des principales causes d'hépatite chronique, de cirrhose du foie et de carcinome hépatocellulaire. Le VHC représente ainsi un problème de santé publique majeur. En effet, près de 170 millions de personnes sont infectées par le VHC dans le monde (Lauer et al. 2001). Bien que le VHC soit endémique dans le monde entier, il existe une distribution géographique hétérogène (Figure 7). Dans les pays industrialisés tels qu'en Australie, au Canada et en Europe du Nord, la prévalence de la maladie est faible ( $< 1\%$ ). La prévalence est d'environ  $1\%$  dans les pays d'endémicité moyenne comme les Etats-Unis d'Amérique et la plupart des pays d'Europe. Cette prévalence est élevée ( $> 2\%$ ) dans de nombreux pays d'Afrique, d'Amérique latine et centrale et dans le Sud-est de l'Asie. Dans ces pays, la prévalence varie de  $5$  à  $10\%$ , voire parfois plus. En Europe, près de 9 millions de personnes sont infectées avec une prévalence moyenne de  $1,03\%$  (Sy et al. 2006). En France, on estime que  $550\ 000$  à  $600\ 000$  personnes sont porteuses du VHC, soit  $1$  à  $1,3\%$  de la population.



**Figure 7 : Prévalence de l'infection par le VHC dans le monde (source, OMS 2007).**

La transmission du VHC se fait principalement par voie parentérale. Avant le développement de tests sérologiques en 1991, les transfusions sanguines étaient le mode principal de transmission du VHC. A ce jour, la principale cause de transmission dans les pays développés est la toxicomanie par voie intraveineuse. D'autres cas de transmission ont été reportés lors d'actes médicaux comme l'endoscopie ou la dialyse, mais aussi l'utilisation de matériel chirurgical ou dentaire mal aseptisé. Les tatouages, les piercings et l'acupuncture représentent également un risque de contamination non négligeable (Alter 2007). La transmission sexuelle est très rare comparée au VIH (Wyld et al. 1997).

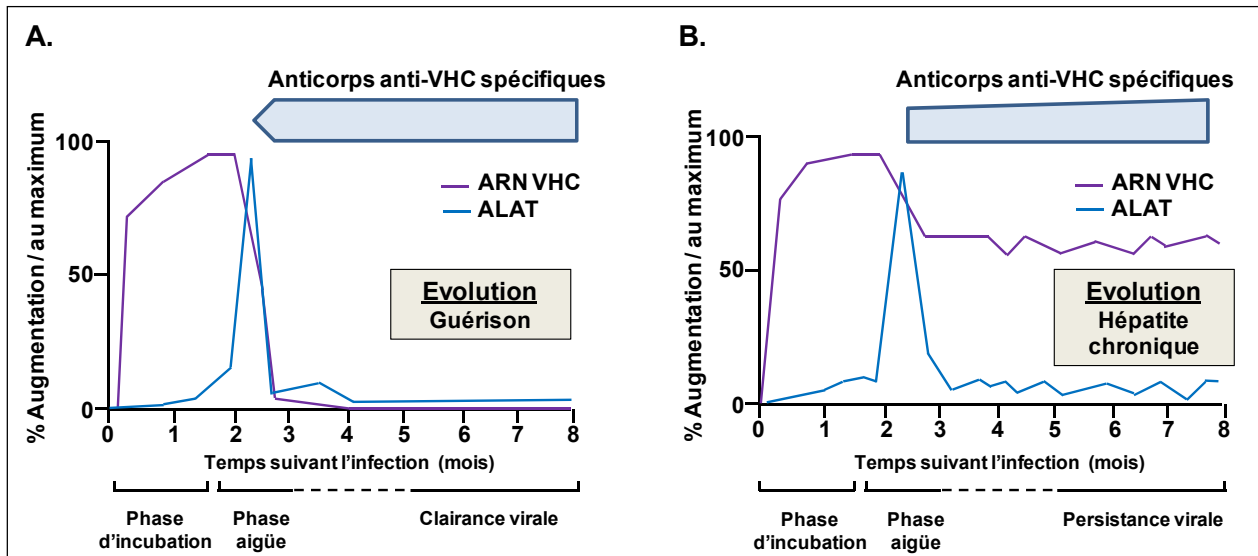
L'hépatite C est une maladie progressive : la phase aigüe évolue le plus souvent vers une hépatite chronique, qui à long terme peut conduire à la cirrhose et au carcinome hépatocellulaire (CHC) (Figure 8).



**Figure 8 : Histoire naturelle de l'infection par le VHC.** Environ 25 % des personnes infectées vont guérir spontanément après une hépatite aiguë la plupart du temps asymptomatique, tandis qu'environ 75 % des personnes infectées vont évoluer vers une infection chronique du foie qui peut se compliquer par une cirrhose et un carcinome hépatocellulaire dans les 20 à 30 ans suivant la primo-infection.

Lors d'une **infection aiguë** par le VHC, qui est le plus souvent asymptomatique, seuls 20 à 30 % des patients présentent des signes cliniques, le plus souvent peu spécifiques (fatigue, nausées, ictère, vomissement, anorexie). La période d'incubation est courte, de 4 à 12 semaines, suivie d'une augmentation du taux des transaminases (ALAT). En moyenne, environ 25 % des patients éliminent spontanément le virus, le plus souvent dans les 3 mois suivant les signes cliniques, car une réponse immunitaire efficace s'est mise en place (Figure 9). Les hépatites C aiguës fulminantes sont rares et observées chez moins de 1% des patients. Après la primo-infection, le VHC persiste dans l'organisme dans plus de 70%, malgré une réponse immunitaire cellulaire et humorale spécifique du VHC (Brown 2005). L'**hépatite C chronique** est définie par la présence d'ARN VHC détectable dans le sang pendant plus de 6 mois (Figure 9). L'infection chronique reste asymptomatique dans la plupart des cas, mais peut s'accompagner d'une asthénie et dans certains cas de manifestations extra-hépatiques telles qu'une cryoglobulinémie, une néphropathie et une pathologie thyroïdienne (Zignego et al. 2007). Cette forme d'hépatite chronique progresse

plus rapidement chez les patients de plus de 40 ans, les hommes et les patients consommant de l'alcool. C'est la ponction biopsie hépatique (PBH) qui va permettre d'évaluer la gravité de l'atteinte hépatique en déterminant le score METAVIR qui associe un score de fibrose (F0 à F4) et un score d'activité (A0 à A3). Parmi les patients infectés chroniquement, environ 25 % vont développer une cirrhose (Hoofnagle et al. 1997). Chez une proportion non négligeable de patients (1-4 %), la pathologie évolue jusqu'au **carcinome hépatocellulaire** (CHC) (Lauer et al. 2001). Le taux de décompensation chez les patients qui présentent une cirrhose est estimé à 4% et le taux de mortalité annuel chez les patients qui décompensent à 15 % dans les pays industrialisés contre 30 % dans les pays émergents.



**Figure 9 : Cinétique des marqueurs de l'infection aiguë (A) et chronique (B).** (A) le diagnostic de l'infection aiguë est confirmée par la détection d'ARN VHC dans le plasma avec une séroconversion objectivée dans anticorps anti-VHC. En moyenne 25 % des patients élimineront spontanément le virus dans les 3 mois. (B) Environ 75 % des personnes infectées vont évoluer vers une infection chronique (présence d'ARN VHC détectable dans le sang plus de 6 mois). La forme d'infection chronique la plus fréquente se traduit par une activité des ALAT élevée.

Le traitement actuel contre le VHC est basé sur une association entre une forme stabilisée de l'interféron- $\alpha$ , l'interféron- $\alpha$  pégylé et un analogue nucléosidique, la ribavirine. L'indicateur d'un traitement efficace est basé sur une Réponse Virologique Soutenue (RVS) définie par l'absence d'ARN VHC détectable dans le sérum pendant au moins 24 semaines après l'arrêt du



traitement et la présence d'un niveau normal des ALAT après la fin du traitement. Ce traitement ne permet de guérir que 50% des patients qui ont accès au traitement, tous génotypes confondus (Fried et al. 2002). En effet, il a été démontré plus en détail dans une étude faite au niveau d'un centre hospitalier métropolitain que sur 100 % de patients positifs en sérologie VHC, 90 % ont un ARN VHC détectable dans leur sérum. Plus de 70 % des patients infectés ne sont pas traités à cause de contre-indications au traitement (maladies psychiatriques, abus d'alcool ou de drogues...). Ainsi, seulement 30 % des patients infectés par le VHC recevront le traitement à base d'interféron- $\alpha$  pégylé et de ribavirine. Parmi ces patients, approximativement la moitié répondra au traitement (environ 13 %). Ainsi, il a été démontré que la thérapie à base d'interféron serait efficace pour 5 % des patients infectés (Falck-Ytter et al. 2002). De plus, le traitement est limité par des effets secondaires et un coût élevé (Tai et al. 2009). Les effets secondaires incluent la perte de poids, des nausées, des syndromes grippaux (fièvres, myalgies, frissons), un état dépressif, des désordres neuropsychiatriques et des anomalies hématologiques (Russo et al. 2003). Ceci souligne l'importance de développer de nouvelles cibles thérapeutiques et de nouveaux traitements contre le VHC.

## **ii. L'infection par le VHC dans le contexte de la transplantation hépatique**

Les complications de l'hépatite C chronique, la cirrhose et le carcinome hépatocellulaire, représentent des indications majeures de transplantation hépatique. Malheureusement, la récurrence de l'infection par le VHC sur le greffon est systématique et évolue vers une cirrhose en moins de 5 ans chez une proportion importante de patients. A l'heure actuelle, il n'y a pas de moyen de prévention de la réinfection du greffon par le VHC dans la phase précoce qui suit la transplantation. Le traitement par l'interféron- $\alpha$  pégylé et la ribavirine peut être débuté uniquement au stade tardif, lorsque la charge virale est déjà élevée (Fried et al. 2002; Charlton 2005). Une meilleure connaissance des phases précoces de la réinfection par le VHC pourrait permettre de développer une stratégie préventive.

La réinfection par le VHC après transplantation hépatique est très précoce. L'ARN du VHC est détectable quelques heures après la greffe et la charge virale plasmatique augmente

ensuite très rapidement. Cette augmentation se poursuit au cours du temps pour atteindre, un an après la greffe, des valeurs supérieures d'au moins 10 fois à celles observées avant la greffe. Le taux d'hépatocytes infectés après transplantation hépatique à l'état stable (environ un mois après la greffe) a été estimé à 19% (Powers et al. 2006). La précocité et l'efficacité de la réinfection du greffon par le VHC ont été démontrées grâce à des prélèvements sanguins effectués au cours et immédiatement après la phase anhépatique de la transplantation hépatique. Chez une population de 9 patients transplantés du foie pour le VHC, le sang a été prélevé 1 jour avant la greffe, puis tous les jours pendant 30 jours. Fukumoto et collaborateurs ont montré que la moyenne de la demi-vie *in vivo* du VHC était de 4h (2 - 5,2h). Chez 8 patients, la virémie post-greffe augmente dès le 3<sup>ème</sup> jour et les charges virales dépassent celles mesurées avant la greffe dès le 8<sup>ème</sup> jour (Fukumoto et al. 1996). Garcia-Retortillo et collaborateurs ont montré dans une cohorte de 20 patients infectés par le VHC, et subissant une transplantation hépatique, que la charge virale VHC diminue au cours de la phase anhépatique (45 - 207 min) chez 18 patients. La demi-vie du VHC au cours de cette phase était de l'ordre de 2,2h (0,22 - 10,3h). Après la reperfusion du greffon, la charge virale diminue pendant les 8 - 24h avec une demi-vie de 3,4h (0,71 - 12,8h) puis augmente très rapidement chez 10 patients sur 20 pour atteindre le taux pré-greffe au 4<sup>ème</sup> jour après la greffe. La charge virale double en moyenne toutes les 13,8h (7 - 35h). Un mois après la greffe, la charge virale VHC est supérieure à celle mesurée avant la greffe chez tous les patients (Garcia-Retortillo et al. 2002). Ces données montrent un taux de renouvellement journalier très rapide du VHC.

L'analyse des quasi-espèces du VHC avant et après la greffe a permis de démontrer qu'après la greffe, la complexité et la diversité des quasi-espèces virales diminuent (Feliu et al. 2004; Hughes et al. 2004; Schvoerer et al. 2007). Cette homogénéisation est le résultat d'un effet d'étranglement (« bottleneck effect ») généré par la réinfection du nouveau foie. L'homogénéisation des quasi-espèces est la conséquence de la sélection d'une fraction de variants qui infectent le nouveau foie. Au cours de la transplantation hépatique, certains variants VHC sont sélectionnés très rapidement après la greffe. En effet, Hughes et collaborateurs ont montré que 1,5 à 2,5h après la reperfusion du greffon, la quasi-espèce présente dans le nouveau foie est significativement plus homogène que celle présente dans le sérum avant la greffe (Hughes et al. 2004). Ce changement de population très précoce suggère que l'efficacité de l'attachement et de l'entrée du VHC dans les hépatocytes jouent un rôle important dans la

sélection des variants viraux, et que seuls les variants les mieux adaptés au nouvel environnement sont sélectionnés. A la différence de la primo-infection par le VHC où les variants viraux infectent le foie en l'absence de toute réponse immunitaire spécifique, la réinfection du nouveau foie au moment de la greffe s'effectue quant à elle dans un environnement où une réponse immunitaire anti-VHC est existante, en particulier les anticorps anti-VHC (Brown 2005). Ces données suggèrent que les variants sélectionnés au cours de la transplantation hépatique sont probablement les mieux adaptés au greffon, mais aussi les moins sensibles à la réponse immunitaire de l'hôte. Cependant jusque là, les mécanismes de sélection des variants VHC au cours de la transplantation hépatique n'étaient pas connus.

### **iii. Rôle des anticorps neutralisants dans la pathogénie du VHC**

Au cours de l'infection par le VHC, l'organisme développe une réponse immunitaire cellulaire et humorale anti-VHC. Plusieurs études ont démontré le rôle important des lymphocytes T CD4 et CD8 dans le contrôle de l'infection (Diepolder et al. 1995; Thimme et al. 2001). En effet, la clairance spontanée du VHC a été observée chez les patients qui ont développé une réponse T CD4 et CD8 forte et dirigée contre plusieurs épitopes viraux. L'impact des anticorps anti-VHC sur l'évolution de l'hépatite C a longtemps été moins bien connu. Farci et collaborateurs ont été les premiers à avoir décrit la présence d'anticorps neutralisants anti-VHC dirigés contre des épitopes situés au niveau de HVR1 de E2 chez le chimpanzé (Farci et al. 1994; Farci et al. 1996). Deux années plus tard, Feray et collaborateurs ont montré que l'administration d'immunoglobulines anti-HBs contenant des anticorps anti-VHC réduisait l'incidence du VHC chez les patients ayant subi une transplantation hépatique (Feray et al. 1998). Plus récemment, Yu et al. ont montré que l'injection de préparations d'immunoglobulines dérivées de plasmas ARN VHC-positifs contenant des anticorps neutralisants anti-VHC conférait aux patients une protection passive contre le VHC (Yu et al. 2004). Toutes ces données suggèrent que les anticorps neutralisants ont un impact réel sur l'infection par le VHC. Néanmoins, elles n'expliquent pas pourquoi la majorité des patients infectés évoluent vers une hépatite chronique, malgré la présence d'une réponse humorale dirigée contre différents épitopes viraux, en particulier ceux des glycoprotéines d'enveloppe.

Récemment, des études *in vitro* utilisant des VHCpp exprimant les glycoprotéines d'enveloppe dérivées des isolats des patients présents à différents stades de l'infection par le VHC, ont permis d'évaluer plus précisément le rôle des anticorps neutralisants dans le contrôle de l'infection par le VHC (Lavillette et al. 2005; Pestka et al. 2007). Ainsi, Lavillette et collaborateurs ont décrit l'émergence d'une réponse neutralisante contre le virus homologue contaminant au cours de la phase aiguë de l'infection par le VHC (Lavillette et al. 2005). Ces auteurs ont aussi montré que la diminution de la charge virale VHC était corrélée à l'émergence d'anticorps neutralisants, alors qu'une charge virale élevée stable était corrélée à l'absence d'anticorps neutralisants. Plus récemment, Pestka et collaborateurs ont montré que des anticorps neutralisants sont produits pendant la phase précoce de l'infection par le VHC et qu'ils jouent un rôle important dans la clairance spontanée de l'infection aiguë (Pestka et al. 2007). Chez une cohorte de femmes infectées accidentellement par la même souche de VHC et suivies pendant 17 ans, les auteurs ont étudié la corrélation entre le taux d'anticorps neutralisants et la charge virale au cours de la phase précoce (1 à 6 mois après la primo-infection) et la phase tardive (10 à 17 ans après). Chez les femmes ayant guéri, l'élimination du VHC était associée à la production d'anticorps neutralisants au cours de la phase précoce de l'infection, le titre de ces anticorps diminuant puis se négativant au cours des années suivant l'élimination du VHC. En revanche, chez les femmes qui développent une infection chronique, la persistance du VHC était associée à un taux faible, voire à l'absence d'anticorps neutralisants pendant la phase précoce, le titre de ces anticorps augmentant au cours de la phase chronique de la maladie (10 à 17 ans après). L'incapacité de développer, très précocement des anticorps neutralisants pourrait donc favoriser l'échappement viral et la persistance du VHC.

Au décours de l'hépatite chronique, les patients développent des taux élevés d'anticorps neutralisants (Bartosch et al. 2003; Logvinoff et al. 2004; Pestka et al. 2007). Paradoxalement, ces anticorps sont incapables de contrôler l'infection par le virus. L'échappement viral aux anticorps neutralisants chez les patients peut s'expliquer par différents mécanismes : (i) dans le modèle chimpanzé, il a été confirmé que la grande variabilité du VHC au cours du temps induisait des variations au niveau des épitopes normalement reconnus par les anticorps et favorisait l'échappement viral (Bartosch et al. 2003), (ii) l'interaction entre les glycoprotéines d'enveloppe, les lipoprotéines de haute densité (HDL) et le facteur de l'hôte SR-BI a été décrite

comme un moyen de protection du virus contre les anticorps neutralisants (Bartosch et al. 2005; Dreux et al. 2006), (iii) l'interaction physique entre le VHC et les lipoprotéines de basse densité au cours des étapes précoces de l'infection pourrait elle aussi atténuer l'effet des anticorps neutralisants (Molina et al. 2007) et (iv) comme pour d'autres virus tel le VIH, l'échappement viral peut être multifactoriel: mutations ponctuelles, insertions/délétions, ou changements de sites de glycosylation (Helle et al. 2006; Falkowska et al. 2007) ou de conformation qui masqueraient les sites de fixation sur les glycoprotéines d'enveloppe et empêcheraient la fixation des anticorps neutralisants.

Plus récemment, le suivi pendant 30 ans d'un patient ayant une hépatite C chronique modérée a permis de mettre en évidence que le virus échappait continuellement à la réponse immunitaire par des mutations répétées qui entraînaient une perte de reconnaissance des glycoprotéines d'enveloppe virales par les anticorps (von Hahn et al. 2007), traduisant une pression de sélection exercée par ces anticorps. Ces données suggèrent qu'au cours de l'hépatite C chronique, il existe un décalage entre l'évolution des glycoprotéines d'enveloppe des quasi-espèces et la production des anticorps correspondants. De plus, dans une étude récente, un nouveau mécanisme d'échappement aux anticorps neutralisants a été décrit à partir d'immunoglobulines provenant de patients chroniquement infectés et contenant des anticorps « interférants » en plus d'anticorps neutralisants (Zhang et al. 2007; Zhang et al. 2009). L'analyse de ces immunoglobulines a révélé la présence de deux épitopes (épitopes I et II) dans la glycoprotéine d'enveloppe E2. L'épitope I est impliqué dans la neutralisation tandis que la fixation d'anticorps anti-épitope II bloque l'action des anticorps anti-épitope I empêchant ainsi leur activité neutralisante. Ces données suggèrent que les patients infectés ont des anticorps neutralisants, mais aussi des anticorps interférants, ceci permettant au virus d'échapper à la réponse immunitaire humorale.

L'ensemble de ces études montre la complexité des stratégies mises en place par le VHC pour échapper à la réponse immunitaire de l'hôte et persister dans l'organisme. Ces résultats ont des retombées directes sur les recherches pour la mise au point d'un vaccin prophylactique qui devra être capable d'induire une réponse immunitaire humorale et cellulaire forte et durable contre les différents géotypes du VHC.

# OBJECTIFS

Après la primo-infection, le VHC persiste dans l'organisme dans plus de 70% des cas, malgré une réponse immunitaire cellulaire et humorale spécifique du VHC. En France, il y a environ 550 000 porteurs chroniques et 5000 nouveaux cas par an. Le traitement actuel qui associe l'interféron pégylé et la ribavirine ne permet de guérir que 50% des patients traités tous génotypes confondus. Les complications de l'hépatite C chronique, la cirrhose et le carcinome hépatocellulaire représentent des indications majeures de transplantation hépatique. Malheureusement la récurrence de l'infection par le VHC sur le greffon est systématique et évolue vers une cirrhose en moins de 5 ans chez une proportion importante de patients. A l'heure actuelle, il n'y a pas de moyen pour prévenir la réinfection du greffon par le VHC dans la phase précoce qui suit la transplantation. Le traitement par l'interféron pégylé et la ribavirine peut être débuté uniquement au stade tardif lorsque la charge virale est déjà élevée. La récurrence virale influe sur la survie (66% à 5 ans et 54% à 10 ans). Au sein du laboratoire, l'équipe du Pr. Stoll-Keller ainsi que d'autres équipes ont précédemment montré que seule une fraction de variants viraux est sélectionnée au moment de la greffe. Les mécanismes par lesquels les variants viraux sont sélectionnés et échappent à l'immunité de l'hôte pour persister chez les patients transplantés n'avaient pas encore été élucidés. A la fois les facteurs de l'hôte et du virus semblent déterminants pour l'échappement à la réponse de l'hôte et pour l'adaptation virale post-transplantation. L'entrée virale est la première étape de l'infection du foie par le VHC et donc un facteur important pour l'initiation de la réinfection du greffon hépatique. L'entrée virale est aussi la principale cible des anticorps neutralisants qui sont la première ligne de défense de l'immunité adaptative de l'hôte inhibant la propagation virale. Une meilleure connaissance des phases précoces de la réinfection pourrait permettre de développer une stratégie préventive efficace et adaptée.

L'objectif principal de mon travail de thèse a été d'étudier les mécanismes de la réinfection du greffon par le VHC après transplantation hépatique afin de permettre le développement de nouvelles stratégies préventives et/ou thérapeutiques efficaces. Au laboratoire, nous avons accès à des prélèvements séquentiels (avant, 7 jour après et 1 mois après transplantation hépatique) de sérums d'une cohorte de 6 patients transplantés hépatique ([ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00213707](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT00213707)).

Dans un premier temps, mon travail a consisté à étudier le pouvoir infectieux et la neutralisation par les anticorps présents dans le sérum des patients transplantés, des variants VHC sélectionnés et non sélectionnés après la greffe hépatique afin de déterminer si ces deux facteurs sont essentiels pour la persistance virale pendant la première phase de l'infection du greffon (**publication n°1 ; Fafi-Kremer S, Fofana I et al., Journal of Experimental Medicine, 2010**). Par ce travail, nous avons identifié des régions dans les glycoprotéines d'enveloppe impliquées dans l'efficacité de l'entrée virale et dans l'échappement viral aux anticorps neutralisants.

La seconde étape de ce projet a été de définir les mécanismes moléculaires de l'efficacité d'entrée et d'échappement aux anticorps neutralisants. Pour cela, nous avons étudié chez un patient greffé les séquences en acides aminés des glycoprotéines E1 et E2 entre le variant majoritaire sélectionné suite à la greffe et un variant non sélectionné. Par mutagenèse dirigée nous avons produit des VHCpp chimères et identifié les mutations impliquées dans l'entrée et l'échappement viral aux anticorps neutralisants (**publication n°2 ; Carolla P\*, Fofana I\* et al., soumis, \* contribution équivalente**).

Enfin, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à l'action d'anticorps monoclonaux dirigés contre le facteur de l'hôte CLDN1 essentiel à l'infection par le VHC, afin de développer une nouvelle approche antivirale pour la prévention de la réinfection du greffon lors de la transplantation hépatique (**publication n°3 ; Fofana et al. Gastroenterology, 2010**).

# RESULTATS

## **PARTIE I:**

### **L'INFECTIOSITE ET L'ECHAPPEMENT AUX ANTICORPS NEUTRALISANTS JOUENT UN ROLE DETERMINANT DANS LA SELECTION DES VARIANTS DU VIRUS DE L'HEPATITE C APRES LA TRANSPLANTATION HEPATIQUE**

#### **Publication n°1**

**Viral entry and escape from antibody mediated neutralization influence hepatitis C virus reinfection in liver transplantation**

***Journal of Experimental Medicine, 2010, volume 207, pages 2019-2031***

---

A partir de prélèvements séquentiels (avant transplantation hépatique (TH), 7 jours et 1 mois après TH) de six patients greffés pour hépatopathie due au VHC de génotype 1b, nous avons identifié les variants majoritaires et minoritaires présents avant la greffe et ceux sélectionnés après la greffe en se basant sur le clonage et séquençage de la région hypervariable HVR1. En construisant des VHCpp exprimant les glycoprotéines d'enveloppe des variants isolés chez les patients et en évaluant leur pouvoir infectieux sur la lignée hépatocytaire Huh7 et sur les hépatocytes primaires, nous avons montré pour la première fois qu'au cours de la transplantation hépatique les variants du VHC sélectionnés après la greffe (qui réinfectent le greffon) entrent plus efficacement dans la cellule hôte. De plus, l'analyse de la neutralisation des VHCpp par les anticorps des sérums autologues collectés avant la greffe nous a permis de mettre en évidence une neutralisation moins efficace des variants réinfectant le greffon par rapport aux variants non



sélectionnés. Ces résultats suggèrent que la réinfection immédiate du greffon s'effectue par des variants ayant une forte infectiosité et échappant aux anticorps neutralisants du patient greffé.

Dans un deuxième temps, nous avons pu montrer que les variants sélectionnés peuvent être efficacement neutralisés par un anticorps monoclonal de souris anti-E2 (AP33). Ceci suggère que l'entrée du virus est une cible prometteuse pour une immunothérapie passive.

La prochaine étape de ce projet a été de définir les mécanismes moléculaires de l'efficacité d'entrée et d'échappement aux anticorps neutralisants. Pour cela, nous avons comparé chez un patient greffé les séquences en acides aminés des glycoprotéines E1 et E2 entre le variant majoritaire sélectionné suite à la greffe et un variant non sélectionné. Par mutagenèse dirigée nous avons produit des VHCpp issues de clones chimères: le domaine entre les acides aminés (aa) 425-483 a été permuté entre le variant faiblement infectieux et le variant fortement infectieux sélectionné lors de la greffe. Nous avons montré que cette permutation entraîne une abolition du pouvoir infectieux du variant sélectionné et une augmentation très significative du pouvoir infectieux du variant non sélectionné. Ce domaine est aussi responsable de la sensibilité des variants aux anticorps neutralisants.

# Viral entry and escape from antibody-mediated neutralization influence hepatitis C virus reinfection in liver transplantation

Samira Fafi-Kremer,<sup>1,2,3</sup> Isabel Fofana,<sup>1,2</sup> Eric Soulier,<sup>1,2</sup> Patric Carolla,<sup>1,2</sup> Philip Meuleman,<sup>6</sup> Geert Leroux-Roels,<sup>6</sup> Arvind H. Patel,<sup>7</sup> François-Loïc Cosset,<sup>8</sup> Patrick Pessaux,<sup>2,4</sup> Michel Doffoël,<sup>1,2,5</sup> Philippe Wolf,<sup>1,2,4</sup> Françoise Stoll-Keller,<sup>1,2,3</sup> and Thomas F. Baumert<sup>1,2,3,5</sup>

<sup>1</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 748, F-67000 Strasbourg, France

<sup>2</sup>Université de Strasbourg, F-67000 Strasbourg, France

<sup>3</sup>Laboratoire de Virologie, <sup>4</sup>Pôle des Pathologies Digestives, Hépatiques et Transplantation, and <sup>5</sup>Pôle Hépto-digestif, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, F-67000 Strasbourg, France

<sup>6</sup>Center for Vaccinology, Ghent University and Hospital, 9000 Ghent, Belgium

<sup>7</sup>Medical Research Council Centre for Virus Research, University of Glasgow, Glasgow G11 5JR, Scotland, UK

<sup>8</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 758, Institut Fédératif de Recherche 128, Ecole Normale Supérieure, Université Claude Bernard Lyon 1, Université de Lyon, F-69007 Lyon, France

**End-stage liver disease caused by chronic hepatitis C virus (HCV) infection is a leading cause for liver transplantation (LT). Due to viral evasion from host immune responses and the absence of preventive antiviral strategies, reinfection of the graft is universal. The mechanisms by which the virus evades host immunity to re infect the liver graft are unknown. In a longitudinal analysis of six HCV-infected patients undergoing LT, we demonstrate that HCV variants re infecting the liver graft were characterized by efficient entry and poor neutralization by antibodies present in pretransplant serum compared with variants not detected after transplantation. Monoclonal antibodies directed against HCV envelope glycoproteins or a cellular entry factor efficiently cross-neutralized infection of human hepatocytes by patient-derived viral isolates that were resistant to autologous host-neutralizing responses. These findings provide significant insights into the molecular mechanisms of viral evasion during HCV reinfection and suggest that viral entry is a viable target for prevention of HCV reinfection of the liver graft.**

## CORRESPONDENCE

Thomas F. Baumert:  
Thomas.Baumert@unistra.fr  
OR  
Françoise Stoll-Keller:  
francoise.stoll@unistra.fr

Abbreviations used: ANOVA, analysis of variance; HCV, hepatitis C virus; HCVpp, HCV pseudoparticle; LT, liver transplantation; uPA-SCID, urokinase-type plasminogen activator/severe combined immunodeficient.

Hepatitis C virus (HCV)-related cirrhosis and hepatocellular carcinoma are leading indications for liver transplantation (LT). A major limitation is the universal HCV reinfection of the graft followed by an accelerated course of virus-induced liver disease (Brown, 2005). A prophylactic strategy for prevention of reinfection is lacking, and interferon-based antiviral therapies have limited efficacy and tolerability in LT recipients (Brown, 2005). Thus, recurrent liver disease with poor outcome has become an increasing problem facing hepatologists and transplant surgeons, underlying the urgent need for novel strategies for prevention of reinfection.

The development of preventive antiviral strategies has been hampered by a limited understanding of the mechanisms leading to HCV reinfection. Reinfection occurs within a few

hours of graft reperfusion despite the presence of anti-HCV antibodies (Brown, 2005). Evolution of viral quasispecies rapidly changes after transplantation, and only a small fraction of viral variants present before transplantation is selected after LT (Moreno Garcia et al., 2003; Feliu et al., 2004; Brown, 2005; Schvoerer et al., 2007). These observations suggest that HCV has developed efficient strategies to evade host immunity and adapt rapidly to the new host environment. The mechanisms by which viral variants are selected and HCV evades host immunity to establish persistence in transplanted patients are not understood.

© 2010 Fafi-Kremer et al. This article is distributed under the terms of an Attribution-Noncommercial-Share Alike-No Mirror Sites license for the first six months after the publication date (see <http://www.rupress.org/terms>). After six months it is available under a Creative Commons License (Attribution-Noncommercial-Share Alike 3.0 Unported license, as described at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>).

HCV has a very high replication rate, and the highly error-prone viral polymerase allows for rapid production of minor viral variants that may outpace humoral and cellular immune responses (Bowen and Walker, 2005; Ray et al., 2005; von Hahn et al., 2007; Uebelhoer et al., 2008; Aurora et al., 2009; Dazert et al., 2009). These variants are under constant immune pressure in the infected host, and selection processes lead to domination of the viral quasispecies by the most fit virus that can also evade immune recognition (Uebelhoer et al., 2008).

Both viral and host factors are potential determinants for evasion from host responses and adaptation of the virus after transplantation. Viral entry is the very first step of HCV infection (Evans et al., 2007; Zeisel et al., 2007, 2008; von Hahn and Rice, 2008; Ploss et al., 2009) and is thus an important factor for initiation of infection of the naive liver graft. Moreover, viral entry is a major target of neutralizing antibodies, a first-line host defense inhibiting viral spread. Indeed, the rapid induction of cross-neutralizing antibodies in the very early phase of infection has been suggested to contribute to control of HCV infection (Lavillette et al., 2005; Pestka et al., 2007).

In this study, we aimed to investigate whether viral entry and escape from neutralizing antibodies are determinants for viral evasion and persistence during the very early phase of graft infection. Infectious retroviral HCV pseudoparticles (HCVpps) have been shown to represent a robust and valid system for the study of HCV entry and antibody-mediated neutralization in clinical cohorts (Lavillette et al., 2005; Dreux et al., 2006; Pestka et al., 2007; Grove et al., 2008; Haberstroh et al., 2008; Zeisel et al., 2008; Witteveldt et al., 2009). Using HCVpps bearing viral envelope glycoproteins derived from patients undergoing LT, we show that efficient viral entry and escape from antibody-mediated neutralization are key determinants for selection of viral variants re-infecting the liver graft. Furthermore, we demonstrate that mAbs directed against viral or host entry factors efficiently cross-neutralized infection of human hepatocytes by patient-derived viral isolates that were resistant to autologous host-neutralizing responses. These results define the molecular

mechanisms of viral evasion during HCV reinfection and suggest that viral entry is a viable target for the prevention of HCV reinfection of the liver graft.

## RESULTS

### Composition and diversity of HCV variants before and after LT

To study the impact of viral entry and neutralization on viral evasion during LT, we investigated viral quasispecies evolution in six patients infected with HCV genotype 1b undergoing LT (Table I). A total of 439 clones (mean, 24 per time point and patient; range, 20–31) was obtained by RT-PCR from serum before and 7 d and 1 mo after transplantation. To investigate the evolutionary dynamics of the envelope quasispecies evolution, distribution of viral quasispecies was analyzed as described previously for other cohorts (Farci et al., 2000; Feliu et al., 2004; Schvoerer et al., 2007).

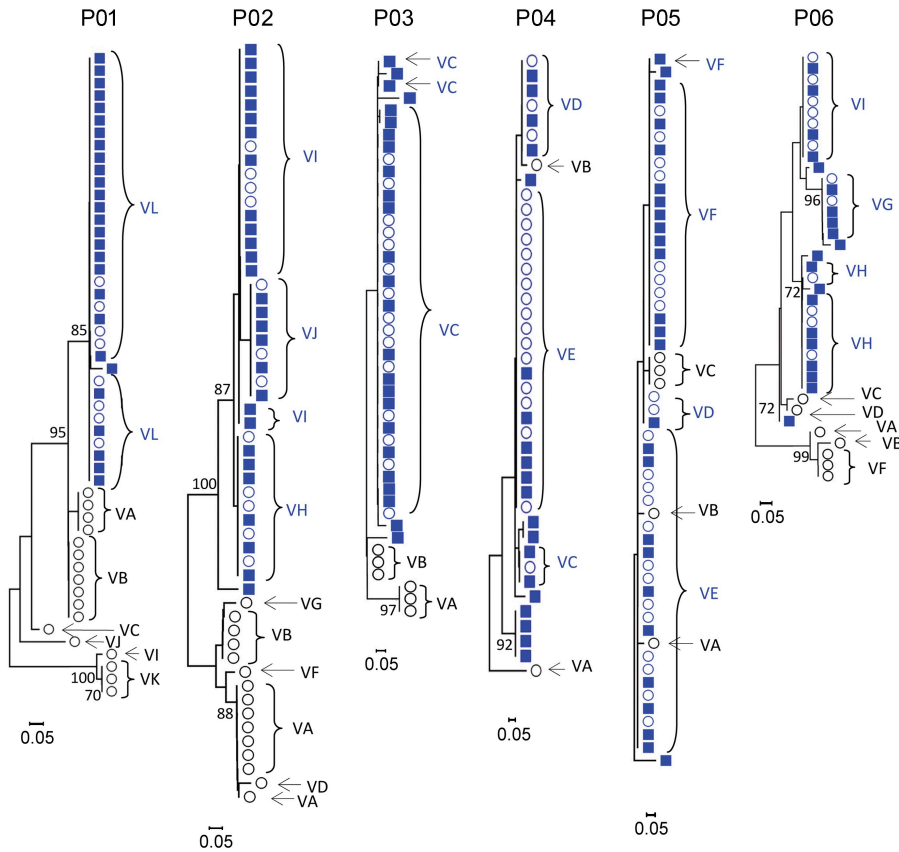
Sequence analysis demonstrated the presence of different viral variants in the serum before and after transplantation (Figs. 1 and 2 and Figs. S1 and S2). Several variants (e.g., VA to VK in patient 01) were not detected after transplantation (termed nonselected variants), whereas other variants (termed selected variants) were detected both before and after transplantation and were the predominant viral isolates after transplantation (e.g., variant VL in patient 01; Fig. 2). Phylogenetic analyses of viral sequences detected before and 7 d after transplantation revealed a marked and abrupt decrease of diversity (bottleneck effect) at day 7 in four out of six patients (P01, P02, P03, and P06), with selected variants clustering in a single branch (Fig. 1). The viral diversity in the other two patients (P04 and P05), which was low before transplantation, remained stable before and after transplantation (Fig. 1).

Compared with the marked decrease in diversity of variants in the majority of patients immediately after transplantation (Fig. 1), the virus population remained homogeneous 1 mo after transplantation (Fig. S1). The mean genetic distances between the sequences obtained at day 7 and those obtained at month 1 were 1%, 1%, <0.1%, 1.1%, 1.3%, and 4% for P01, P02, P03, P04, P05, and P06, respectively. Sequences isolated

**Table I.** Clinical and virological features of HCV-infected patients undergoing LT

Patient number	Age R/D	Gender	Indication of transplantation and MELD	HCV genotype	Viral load			IS treatment
					BT	D7	M1	
	yr				$\log_{10}$ IU/ml	$\log_{10}$ IU/ml	$\log_{10}$ IU/ml	
P01	60/73	Male	Cirrhosis + HCC MELD 9.32	1b	5.94	5.20	5.72	tac/cor
P02	34/65	Male	Cirrhosis MELD 10.37	1b	5.14	4.18	5.14	tac/rap/cor
P03	64/74	Male	Cirrhosis + HCC MELD 9.53	1b	5.61	3.65	6.83	tac/rap/cor
P04	69/15	Female	Cirrhosis + HCC MELD 23.59	1b	6.42	4.94	6.90	tac/rap/cor
P05	51/22	Male	Cirrhosis MELD 14.25	1b	5.39	4.85	5.22	tac/cor
P06	65/68	Female	Cirrhosis + HCC MELD 11.99	1b	5.96	6.19	6.90	tac/rap/cor

HCC, hepatocellular carcinoma; tac, tacrolimus; rap, rapamycin; cor, corticosteroids. Patient number, age of recipient (R) and donor (D), recipient gender, indication of transplantation, model of end-stage liver disease (MELD) score before transplantation, HCV genotype, viral load (before [BT] and day 7 [D7] and month 1 [M1] after transplantation), and immunosuppressive (IS) treatment are shown.



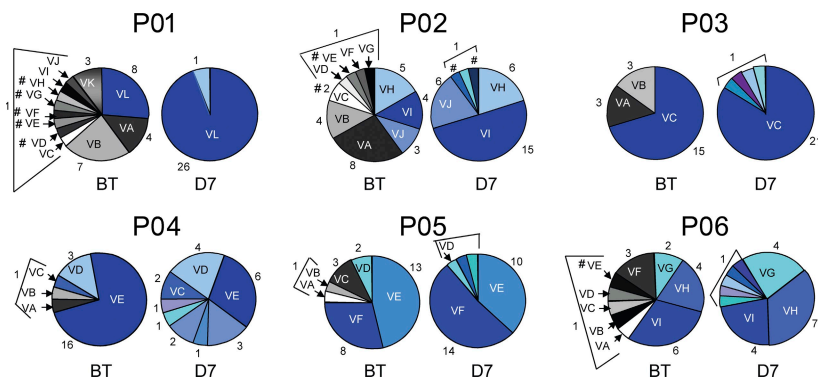
**Figure 1. Phylogenetic analyses of viral quasispecies evolution before and 7 d after LT.** Evolution of HCV variants before and 7 d after LT. Rooted neighbor-joining trees of HCV HVR1 amino acid sequences from the six patients depicted in Table I are shown. Bootstrap values are expressed as percentages per 1,000 replicates. Only bootstrap proportions >70 are indicated. Sequences of variants isolated before LT and not detected on day 7 after transplantation are depicted as open black circles, sequences of variants isolated before LT and reinfected the graft are depicted as open blue circles, and sequences isolated 7 d after LT are depicted as blue squares. Viral isolates used for functional analysis are indicated with capital letters.

**Viral entry is important for selection of viral variants after LT**

To determine the mechanism of selection and evasion of viral variants during reinfection, we produced HCVpps harboring full-length E1E2 glycoproteins of all detected and grouped variants before transplantation (nonselected variants; Figs. 1 and 2) as well as the most prevalent variants reinfected the liver graft (selected variants; Fig. 2). Sequence analysis of

at day 7 and month 1 after LT were clustered in the same branch of phylogenetic trees (Fig. S1), and variants selected at day 7 remained predominant 1 mo after transplantation in all patients (Fig. S1 and not depicted). Sequence analysis of serum samples at month 6 and 12 after transplantation available from three patients demonstrated that variants selected during the early phase of transplantation (P01VL, P04VE, and P06VI) had the same or similar envelope glycoprotein sequence as predominant variants present at later time points after transplantation (unpublished data). These data indicate that the new host environment leads to an abrupt and marked change in the composition and diversity of the viral quasispecies in the majority of patients, which remains relatively stable after transplantation.

viral isolates showed that 13 out of 63 isolates contained stop codons or insertions altering the open reading frame. These variants were not further analyzed for HCVpp production and are indicated by a number sign (#) in the respective pie charts of Fig. 2. Expression of envelope glycoproteins from 33 out of 50 isolates (66%) resulted in the production of infectious HCVpps (Fig. 3). Complete sequences of isolates characterized in functional experiments are shown in Fig. S2. The strains reinfected the graft always produced functional E1E2 (Fig. 3), whereas a large fraction of nonselected variants failed to produce infectious HCVpps (Fig. 3). The percentage of patient-derived viral isolates resulting in infectious HCVpps was higher than in a recent longitudinal study of a



**Figure 2. Evolution of HCV variants before and 7 d after LT.** Distribution of full-length E1E2 variants (mean number of clones per patient, 24; range, 20–31) depicted in Fig. 1 is shown for each patient. Circle graphs represent the percentage of each clone detected. The number of each clone is indicated. Viral isolates are indicated by an individual color and capital letters. Variants containing stop codons, insertions, or deletions altering the HCV open reading frame are depicted with a number sign (#) and were not further analyzed in HCVpp assays. Variants reinfected the liver graft are depicted in blue, and nonselected variants not detected after transplantation are depicted in white, gray, or black. BT, before LT; D7, 7 d after LT

single HCV-infected patient (von Hahn et al., 2007). This difference is most likely caused by virus-specific factors allowing different use of entry factors because we observed a large variation in the percentage of infectious isolates within the six patients (37–100%). Alternatively, technical factors such as the use of more permissive Huh7 cells may have resulted in the isolation of more variants with more easily detectable HCVpp infection in this study.

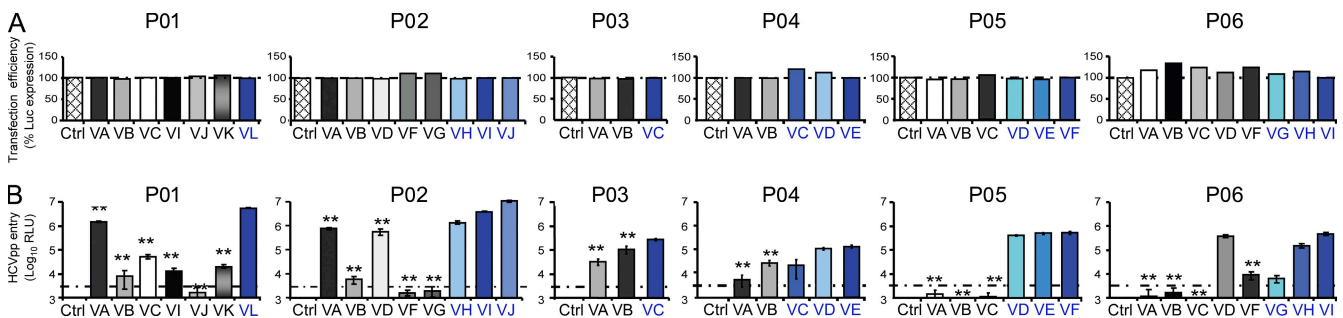
To address whether the efficiency of infection was different in strains reinfected the liver graft (selected variants) and strains not detected during the first days of LT (nonselected variants), we performed a comprehensive analysis of viral entry of all patient-derived HCVpps containing functional full-length HCV envelope glycoproteins. As shown in Fig. 3, HCVpps generated from variants reinfected the graft were characterized by more efficient entry into Huh7 cells compared with HCVpps generated from nonselected variants that were not detected after transplantation (mean enhancement 152-fold;  $P < 0.0001$ ). To confirm the results obtained with Huh7 hepatoma cell lines, we infected primary human hepatocytes obtained from four different donors with patient-derived HCVpps from selected and nonselected variants. Infection efficiency was 10–100-fold lower in human hepatocytes, as indicated by the level of reporter gene expression in cells infected with the same HCVpp preparations. Similar to results obtained with hepatoma cells, HCVpps of the selected variants showed more efficient entry than HCVpps produced from the nonselected variants (Fig. S3). The difference in viral entry observed between selected and nonselected variants did not result from variations in transfection efficiency (Fig. 3), nor was it caused by impaired HCVpp assembly or release because the levels of envelope glycoprotein incorporation into different pseudoparticles were similar (Fig. S4). These results demonstrate that viral isolates that are selected during

transplantation are characterized by more efficient entry compared with isolates not detected after transplantation. Collectively, these data suggest that the efficiency of viral entry into naive hepatocytes of the liver graft is important for selection of viral variants after LT.

### HCV variants reinfected the liver graft escape autologous neutralizing responses

Because viral entry is a major target of neutralizing antibodies and HCV reinfection of the liver graft occurs efficiently despite the presence of high titer of anti-HCV antibodies, we investigated whether neutralizing antibodies present in pretransplantation serum were able to neutralize infection of patient-derived HCVpps. Patient-derived HCVpps were preincubated with autologous pretransplantation serum, and their subsequent infection levels were quantified. As shown in Fig. 4, HCVpps derived from selected variants were only poorly neutralized by antibodies present in pretransplant serum (mean neutralizing titer, 1:69; range, 1:20 to 1:200). In contrast, HCVpps derived from HCV variants that were not detected after transplantation were efficiently neutralized by autologous host-neutralizing antibodies (mean neutralizing titer, 1:2,257; range, 1:200 to 1:6,400). The differences between neutralization of selected and nonselected variants were highly significant ( $P < 0.001$ ). Furthermore, nonselected isolates showing high infectivity (e.g., strains P01VA, P02VA, P02VD, and P06VD) were efficiently neutralized by autologous pretransplant serum as shown in Fig. 4. These data demonstrate that escape from antibody-mediated neutralization represents an important mechanism for viral evasion from host immunity during LT.

To ensure that the selected variants emerge because of a clear competitive advantage and not just by chance, we analyzed HCV infection in the chimeric liver uPA-SCID (urokinase-type



**Figure 3. Viral entry is important for selection of viral variants after LT.** (A) Transfection efficiency was analyzed for each variant and control (Ctrl; empty vector without E1E2) by quantifying luciferase expression (expressed as normalized percentage of transfection efficiency based on the predominant selected variant). (B) Comparative analysis of viral entry of HCVpps containing full-length E1E2 functional envelope proteins from pretransplant variants in Huh7 cells depicted in Fig. 2. HCVpps bearing patient-derived HCV envelope glycoproteins were added to Huh7 cells, and infection was analyzed by luciferase reporter gene expression. Results are expressed in relative light units (RLU) plotted in a logarithmic scale. The threshold for a detectable infection in this system is indicated by dashed lines. The detection limit for positive luciferase reporter protein expression was  $3 \times 10^3$  RLU/assay, corresponding to the mean  $\pm$  3 SD of background levels, i.e., luciferase activity of naive noninfected cells or cells infected with pseudotypes without HCV envelopes (Dimitrova et al., 2008). Background levels of the assay were determined in each experiment. Means  $\pm$  SD from at least four independent experiments (performed in triplicate) are shown. Statistically significant differences (repeated measures ANOVA) in HCVpp entry between the predominant selected strain and nonselected strains are indicated by asterisks (\*\*,  $P < 0.001$ ). Variants reinfected the liver graft are depicted in blue, and nonselected variants not detected after transplantation are depicted in white, gray, or black.



plasminogen activator/severe combined immunodeficient) mouse model after injection with pretransplant serum of patient P01 (Meuleman et al., 2008). As shown in Fig. 5, variant P01VL (which was selected after LT in the respective patient) was the most prevalent variant in both plasma and liver of the infected uPA-SCID mouse. This result corroborates the presumed selective advantage of the variant re-infecting the graft and demonstrates the relevance of our analysis and validity of the HCVpp model system for HCV infection *in vivo*.

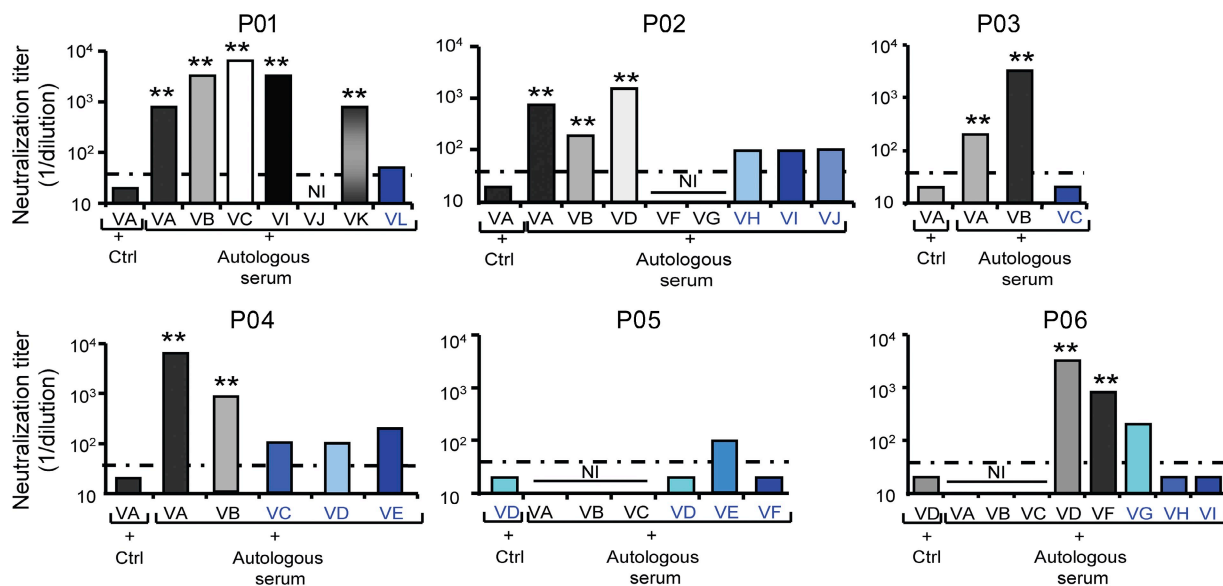
#### Functional analysis of HVR1 (hypervariable region 1) subvariants confirms that phylogenetic grouping allows a representative functional analysis of full-length variants

Grouping of full-length E1E2 quasiespecies (Figs. 1 and 2) was performed on HVR1 variation because quasiespecies grouping based on HVR1 variation has been shown to be the most accurate approach to study the evolutionary dynamics of the HCV quasiespecies population (Farci et al., 2000; Feliu et al., 2004; Schvoerer et al., 2007). To address whether grouping of full-length E1E2 genomes by HVR1 analysis results in selection of clones that are representative of the functional properties of the entire quasiespecies population, we performed a functional analysis of all detected E1E2 subvariants (VA, VB, VK, and VL) containing the same HVR1 of patient P01. This approach allowed us to address the question whether all the subvariants harboring the same HVR1 have the same level of infectivity and if not, what is the ratio of highly infectious subvariants compared with the less infectious ones. As shown in Fig. S5, the

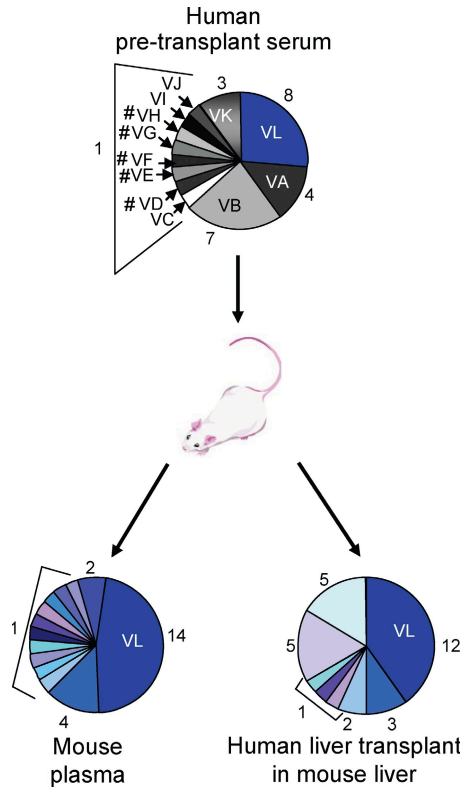
ratio of highly infectious subvariants compared with the less infectious ones was high (5:8) in HVR1 variants with a high infectivity phenotype (VL) and low in HVR1 variants with a low infectivity phenotype (the ratio of high to low infectivity subvariants was 2:4 for VA, 1:7 for VB, and 0:3 for VK subvariants). Most importantly, we demonstrate that all of the nonselected E1E2 subvariants exhibiting high infectivity were efficiently neutralized by autologous patient serum (e.g., subvariants VAs1 and VBs1 in Fig. S5). Finally, grouping of viral quasiespecies on complete envelope glycoprotein sequences with subsequent functional analysis of all individual full-length clones in patient 01 again demonstrated that selected strains were characterized by efficient viral entry and escape from neutralizing responses, whereas nonselected strains exhibited a poor entry and neutralization phenotype (unpublished data). These analyses corroborate that phylogenetic grouping of full-length E1E2 genomes by HVR1 analysis is valid and allows a functional analysis of full-length clones whose function is representative of the entire E1E2 quasiespecies population. Collectively, these analyses confirm that entry and neutralization are important factors for selection of viral variants during HCV reinfection in LT independent of the method of quasiespecies grouping.

#### Mutations in CD81 binding domains of E2 confer enhanced viral entry

To map envelope regions mediating enhanced entry and viral escape, we focused on an individual patient (P01) and exchanged four regions spanning aa 221–483 (C-terminal E1



**Figure 4. Escape from antibody-mediated neutralization is a key determinant for selection of viral variants after LT.** HCVpps were incubated with pretransplant anti-HCV-positive serum or control anti-HCV-negative serum (Ctrl) in serial dilutions for 1 h at 37°C. HCVpp-antibody complexes were then added to Huh7 cells, and infection was analyzed as described in Fig. 3. Calculation of neutralization and determination of background and thresholds for neutralization are described in Materials and methods. End point dilution titers are indicated for each variant. Dashed lines indicate the threshold for a positive neutralization titer corresponding to 1:40. Variants re-infecting the liver graft are depicted in blue, and nonselected variants not detected after transplantation are depicted in white, gray, or black. Means from at least four independent experiments (performed in triplicate) are shown. Statistically significant differences (repeated measures ANOVA) in neutralization between the predominant selected strain and nonselected strains are indicated by asterisks (\*\*,  $P < 0.001$ ). NI, noninfectious.



**Figure 5. Evolution of HCV variants in the uPA-SCID mouse model infected with patient-derived pretransplant serum.** A human liver-chimeric mouse was challenged by intraperitoneal injection of pretransplant serum of patient P01 (infectious dose administered,  $3.3 \times 10^6$  IU) and sacrificed at week 3 after infection. HCV RNA was isolated and amplified by RT-PCR from liver and plasma as described previously (Schvoerer et al., 2007). HCV isolates in plasma and liver samples were cloned and sequenced as described in Materials and methods (30 clones per sample in one animal). Circle graphs represent the percentage of each clone detected, and numbers of clones are shown. Variant VL, which was selected after LT in patient P01, was the most prevalent variant in both plasma and liver of the infected uPA-SCID mouse. Variants containing stop codons, insertions, or deletions altering the HCV open reading frame are depicted with a number sign (#).

and N-terminal E2), 221–357 (E1), 358–424 (E2-HVR1), and 425–483 (E2-HVR2) of the envelope glycoproteins of selected variant P01VL and nonselected variant P01VC of patient P01 (Fig. 6, A and B). The exchange of HVR1 of selected and nonselected variants resulted in chimeric HCVpps (P01VCVL-HVR1) with higher infectivity than HCVpps derived from the P01VC parental strain (Fig. 6 C). The exchange of the E2 region comprising aa 425–483 resulted in chimeric HCVpps (P01VCVL-HVR2) with the highest infectivity and poor neutralization by the autologous pretransplant serum, the phenotype of the selected variant (Fig. 6, C and D). These data indicate that mutations in the HCV envelope region E2<sub>425–483</sub> predominantly mediate enhanced viral entry and escape from neutralizing antibodies during reinfection of the liver graft in this patient. Furthermore, these data confirm that the observed differences in entry and neutralization were indeed mediated by mutations in the viral

envelope glycoproteins and were not caused by any technical artifacts or by impairment in HCVpp production. Sequence analysis of P01VC and P01VL showed five mutations in the E<sub>425–483</sub> region (H434Q, A444T, N445H, G458S, and C478R), including one mutation in CD81 BDII (C478R; Fig. 6, Fig. S2, and Table S1). Analysis of the sequences encompassing the same region (aa 425–483) in the other patients showed mutations in the majority of strains of all patients but one (P05; Fig. S2 and Table S1). This finding suggests that mutations in this region are also involved in enhanced entry and sensitivity to neutralization in the other patients. Interestingly, nonselected variants exhibiting a low entry phenotype very frequently showed mutations in CD81 binding domains I, II, and III (Table II and Fig. S2). Collectively, these data support a model whereby acquired mutations alter envelope glycoprotein–CD81 binding, which subsequently modulates the entry phenotype.

Sequence analysis of P01VB and P05 variants did not reveal any amino acid mutations within aa 425–483 or the three CD81 binding domains. The absence of mutations within these regions suggests that in these variants, other envelope regions are responsible for the alteration of the entry and neutralization phenotype (Table II, Fig. S2, and Table S1). These could include SR-BI (scavenger receptor B I) binding sites within HVR1 (Fig. S2) or functional regions that contribute to viral entry steps mediated by claudin-1 or occludin. Interestingly, a further analysis of the full-length E1E2 sequences of low entry variants P05VB and P05VC variants identified two mutations of cysteine residues at positions C229R and C564R, respectively. Structural modeling suggests that these mutations may alter disulfide bond formation, resulting in altered envelope glycoprotein folding (Krey et al., 2010).

### Cross-neutralizing mAbs efficiently inhibit entry of escape variants resistant to host responses

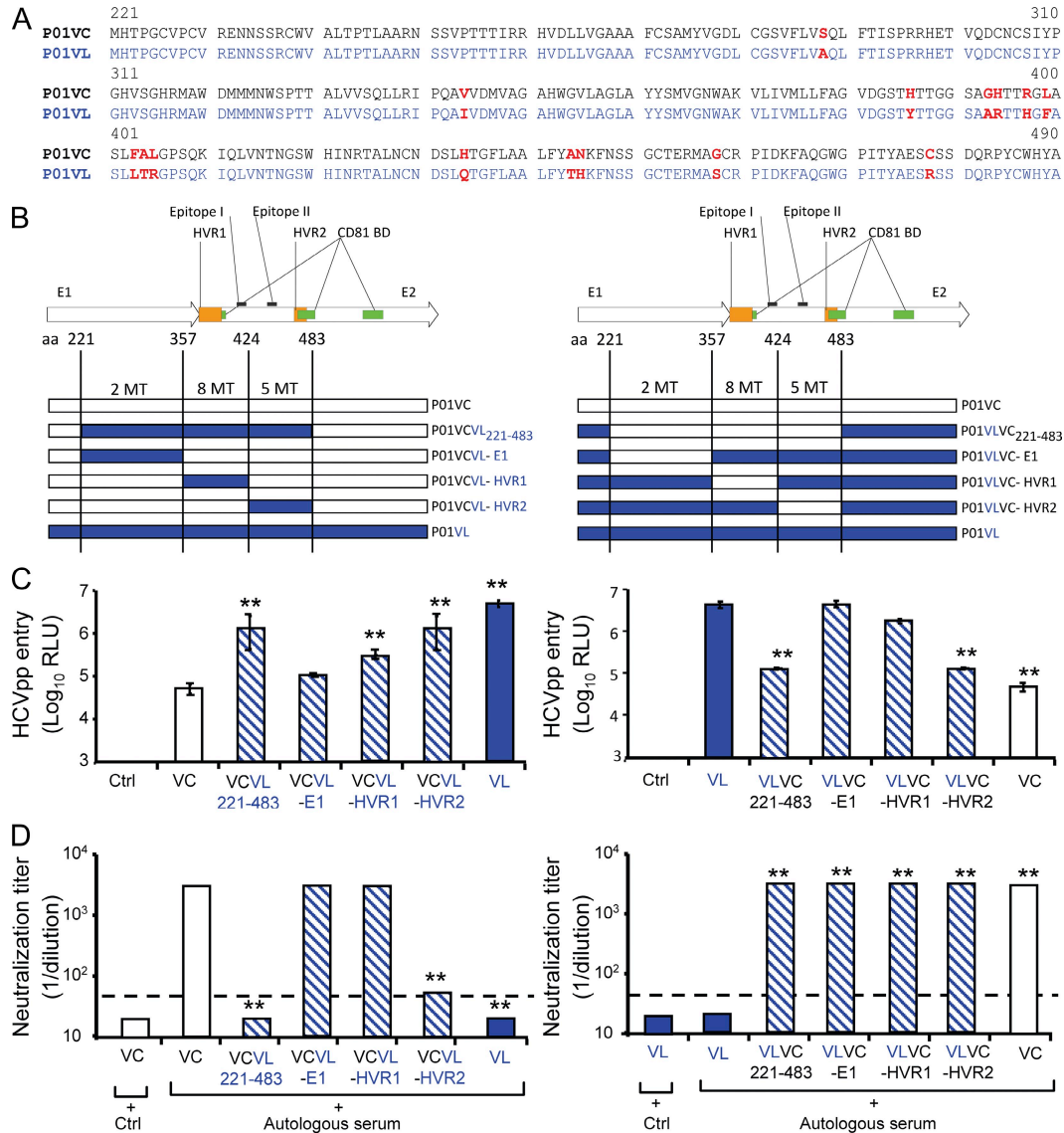
To investigate whether targeting entry of viral isolates infecting the liver graft by cross-neutralizing mAbs is a suitable approach for prevention of HCV reinfection, we incubated patient-derived HCVpps with mAb AP33 directed against an epitope within the HCV E2 protein and studied its ability to neutralize patient-derived HCVpps. As shown in Fig. 7 (A and B), anti-E2 mAb AP33 efficiently inhibited infection of HCVpps containing envelope glycoproteins from both selected and nonselected viral variants in Huh7 cells and primary human hepatocytes ( $IC_{50}$  0.1–3.3  $\mu$ g/ml). Similar results were obtained by preincubating hepatocytes with an mAb directed against the large extracellular loop of HCV entry factor CD81 (Fig. 7 C; Pileri et al., 1998). Efficient neutralization of HCV isolates having escaped autologous neutralizing responses by cross-neutralizing antibodies suggests that targeting viral entry by mAbs is a promising strategy for preventing HCV reinfection of the liver graft.

### DISCUSSION

In this study, we demonstrate for the first time that viral entry into hepatocytes and escape from host-neutralizing antibodies represent important mechanisms for selection of HCV variants

during HCV reinfection of the liver graft. Furthermore, we show that infection of strains selected during transplantation can be efficiently neutralized by broadly neutralizing mAbs. These

findings define the molecular mechanisms of viral evasion during HCV reinfection and pave the way for novel antiviral strategies for prevention of HCV reinfection of the liver graft.



**Figure 6. Mutations in envelope region E2<sub>425-483</sub> mediate enhanced viral entry and escape from neutralizing antibodies.** To map envelope regions mediating enhanced entry and viral escape, we exchanged four regions spanning C-terminal E1 and N-terminal E2, E1, E2-HVR1, and E2-HVR2 of the envelope glycoproteins of selected variant VL and nonselected variant VC of patient P01 (see Figs. 2–4). These regions include aa 221–483, aa 221–357, aa 358–424, and aa 425–483, respectively. (A) Deduced amino acid sequences of the exchanged region between P01VC (black) and P01VL (blue). Amino acid changes are indicated in red bold letters. (B) Construction of recombinant chimeric HCVpps P01VLC<sub>221-483</sub> and P01VLC<sub>221-483</sub>, P01VCVLC-E1 and P01VLCVLC-E1, P01VCVLC-HVR1 and P01VLCVLC-HVR1, and P01VCVLC-HVR2 and P01VLCVLC-HVR2 by exchanging E1E2 envelope domain aa 221–483, aa 221–357, aa 358–424, and aa 425–483, respectively, of nonselected variant VC (patient 01) depicted in white and escape isolate VL (patient 01) depicted in blue (see Figs. 2–4). HVR1 and HVR2 are shown in orange, and CD81 binding domains (CD81 BD) are shown in green. Positions of E2 epitopes I and II are indicated (Zhang et al., 2007, 2009). The number of mutations within each region is shown. (C) Viral entry of HCVpps containing chimeric envelope proteins in Huh7 cells. HCVpps were incubated with Huh7 cells, and infection was analyzed as described in Fig. 3. Results are expressed in relative light units (RLU) plotted in a logarithmic scale. The threshold for a detectable infection is  $3 \times 10^3$  RLU and was determined as described in Fig. 3. (D) Neutralization of HCVpps by autologous pretransplant serum was performed as described in Fig. 4. End point dilution titers are indicated for each variant. Dashed lines indicate the threshold for a positive neutralization titer corresponding to 1:40. Calculation of neutralization and determination of threshold titers are described in Materials and methods. Chimeric HCVpps are depicted in dashed blue. Statistically significant differences (repeated measures ANOVA) in HCVpp entry or neutralization between VC and VL wild-type and mutant variants are indicated by asterisks (\*\*,  $P < 0.001$ ). Ctrl, negative control; MT, mutation.



Both viral and host factors may contribute to HCV reinfection during LT. Viral factors include efficiency of entry, replication, and production of progeny virus. Host factors include humoral and cellular responses, graft- or donor-related factors, and immunosuppressive therapy. The pretransplantation environment is characterized by chronic HCV infection, where viral population is subjected to selective pressures from both

humoral and cellular immunity. Viral variants evade immune response by continuous generation of B and T cell escape variants (von Hahn et al., 2007), resulting in slow and progressive change in composition of viral quasispecies with coexistence of highly neutralized and escape viral variants (von Hahn et al., 2007). In contrast, the early phase of the posttransplantation period is characterized by rapid de novo infection of naive

**Table II.** Mutations within CD81 binding domains of viral variants

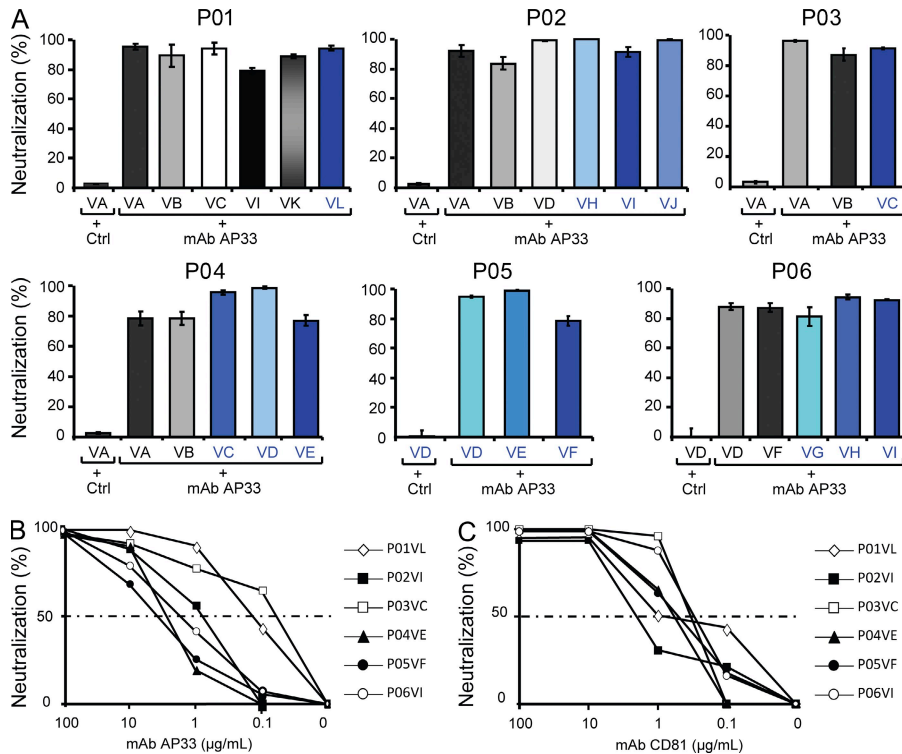
Viral variants	CD81 BDI amino acid positions				CD81 BDII amino acid positions									CD81 BDIII amino acid positions							
	412	414	416	420	474	475	476	477	478	479	480	481	492	521	522	524	528	531	533	537	538
P01VL <sup>a</sup>	Q	V	T	W	Y	A	E	S	R	S	S	D	Q	R	S	V	T	E	K	L	L
P01VA <sup>a</sup>																					
P01VB <sup>b</sup>																					
P01VC <sup>b</sup>									C				K								
P01VI <sup>b</sup>															L						
P01VK <sup>b</sup>								P			L				F			A	E		
P01VJ <sup>c</sup>		I						P					R		L						
P02VI <sup>a</sup>	Q	I	T	W	Y	A	E	P	H	D	L	G	Q	R	S	A	N	E	E	L	I
P02VJ <sup>a</sup>									Q				D	R							
P02VH <sup>a</sup>									Q				D	R							
P02VA <sup>a</sup>		V											D								
P02VD <sup>a</sup>		V											D	R							
P02VB <sup>b</sup>				L						A			D								
P02VF <sup>c</sup>			S						R		S		D	R							
P02VG <sup>c</sup>		V											D	R		T					
P03VC <sup>a</sup>	K	V	T	W	Y	A	K	P	N	S	S	D	R	R	F	A	S	E	E	L	L
P03VA <sup>a</sup>	Q							E	T												
P03VB <sup>b</sup>								E													
P04VE <sup>a</sup>	Q	I	T	W	Y	A	E	P	R	S	L	D	Q	R	F	V	N	E	E	L	L
P04VD <sup>a</sup>																					
P04VC <sup>b</sup>																					
P04VA <sup>b</sup>										N					K						
P04VB <sup>b</sup>																					
P05VE <sup>a</sup>	Q	V	T	W	Y	T	E	P	E	A	L	D	Q	R	F	V	S	E	E	L	L
P05VF <sup>a</sup>																					
P05VD <sup>a</sup>																					
P05VA <sup>c</sup>																					
P05VB <sup>c</sup>																					
P05VC <sup>c</sup>																					
P06VH <sup>a</sup>	Q	I	T	W	H	V	V	P	H	G	L	D	R	R	F	A	T	E	E	F	I
P06VI <sup>a</sup>									R												
P06VD <sup>a</sup>													Q								
P06VG <sup>b</sup>						A			R												
P06VF <sup>b</sup>					Y	A	E	S	R	S					V	N				L	L
P06VA <sup>c</sup>					Y	A	E		R	S											
P06VB <sup>c</sup>					Y	A	E		R	S					V	N				L	L
P06VC <sup>c</sup>																					

BD, binding domain; RLU, relative light unit. For each patient, amino acid changes in the CD81 BDI, BDII, and BDIII (Owsianka et al., 2006) relative to the most prevalent variant showing efficient viral entry are indicated. Amino acid positions where at least one mutation was observed in the six patients are shown; conserved amino acid positions are not depicted.

<sup>a</sup>Variants showing high infectivity ( $RLU \geq 5 \log_{10}$ ).

<sup>b</sup>Variants showing low infectivity ( $5 \log_{10} \geq RLU \geq 3.5 \log_{10}$ ).

<sup>c</sup>Noninfectious variants ( $RLU \leq 3 \log_{10}$ ).



**Figure 7. Cross-neutralization of escape variants infecting the liver graft by anti-envelope and anti-receptor mAbs.** (A) Neutralization of HCVpp from viral isolates by cross-neutralizing anti-E2 mAb AP33. HCVpp derived from different isolates were incubated with 10 μg/ml anti-E2 AP33 or isotype monoclonal control IgG, and neutralization of viral entry in Huh7 cells was determined as described in Fig. 4 (entry in the presence of isotype monoclonal control IgG = 100%). Neutralization was calculated as described in Materials and methods. Means ± SD from three independent experiments (performed in triplicate) are shown. (B and C) Neutralization of HCV isolates having escaped patients' neutralizing responses by anti-E2 and anti-CD81 mAbs in primary human hepatocytes. HCVpp derived from viral isolates selected after LT (P01VL, P02VI, P03VC, P04VE, P05VF, and P06VI) were incubated with serial dilutions of anti-E2 AP33 (B) or control IgG from mouse (Ctrl) as described in Fig. 4 and then added to primary human hepatocytes. For analysis of neutralization using anti-CD81, primary human hepatocytes were preincubated with anti-CD81 or isotype control IgG for 1 h at 37° before incubation with patient-derived HCVpp (C). Means from one representative experiment (performed in triplicate) out of two independent experiments are shown. 50% neutralization of HCVpp entry is indicated by a dashed line.

hepatocytes in a host with impaired cellular immune responses. As shown by phylogenetic analyses (Fig. 1), this change of host environment results in an abrupt and marked change in the composition of viral quasispecies population. Phylogenetic analyses demonstrated a decrease in the quasispecies diversity after LT, with selection of only a fraction of relatively homogeneous viral variants in the majority of patients (Fig. 1). Thus, it is likely that the implantation of the new liver and start of immunosuppressive therapy generate a bottleneck effect by selecting variants that are able to infect the liver graft more efficiently. Because viral entry is a key determinant for the efficient and rapid initiation of viral infection and neutralizing antibodies are a first-line host defense in the transplanted liver, the ability of a viral isolate to efficiently infect naive hepatocytes and escape host-neutralizing responses may be an important advantage for the initiation of graft infection, allowing rapid dissemination of the virus. Indeed, the functional investigation of entry and neutralization of patient-derived viral particles before and after transplantation demonstrates that viral variants selected during transplantation were characterized by more efficient viral entry and escape from neutralizing antibodies compared with viral variants not detected after transplantation. This suggests that entry and evasion from antibody-mediated neutralization play a key role for selection of viral variants in the early phase of transplantation. The concept that the selected variants emerge because of a clear competitive advantage and not just by chance is further supported by the analysis of HCV infection in the chimeric liver uPA-SCID mouse model (Fig. 5): the variant which was selected after LT in the respective patient was the most prevalent variant in both plasma and liver of the infected

uPA-SCID mouse. This result corroborates the presumed selective advantage of the variant reinfecting the graft and confirms that the abrupt change of the host environment leads to selection of viral variants with an efficient entry phenotype.

The key impact of escape from neutralization is underlined by the finding that all nonselected variants, including isolates showing high infectivity (e.g., strains P01VA, P02VA, P02VD, and P06VD), were efficiently neutralized by autologous pretransplant serum and that all selected variants, including isolates with a lower infectivity phenotype (P02VH, P04VC, P06VG, P06VH, and P06VI), escaped neutralization (Figs. 3 and 4).

Interestingly, in all patients undergoing LT, the strains having escaped host immune responses after transplantation were also among the most prevalent strains before transplantation (Figs. 2–4). These findings indicate that efficient entry and evasion from neutralizing responses result already in a survival advantage of the virus in the patient with end-stage liver disease and suggest that preselection of strains occurs already before transplantation. Nevertheless, the marked and abrupt homogenization of quasispecies observed in phylogenetic analyses (Fig. 1), the stability of variants after transplantation (Fig. S1), and the relative advantage of selected variants in the uPA-SCID mouse model (Fig. 5) suggest that the identified shifts in the viral populations with selection of neutralization-resistant and entry-efficient variants are related to the reinfection situation and do not simply represent processes that occur continuously during chronic infection.

Grouping of full-length E1E2 quasispecies (Figs. 1 and 2) was performed on HVR1 variation because quasispecies grouping based on HVR1 variation has been shown to be the most accurate approach to study the evolutionary dynamics of the HCV quasispecies population (Farci et al., 2000; Feliu et al., 2004; Schvoerer et al., 2007). The validity of this approach for our cohort was confirmed by a side by side comparison of phylogenetic analysis of HVR1 and full-length E1E2 sequences: when HVR1 was excluded, the phylogenetic reconstructions of the rest of the E1E2 region showed a monophyletic population with absent discrimination between selected and nonselected variants similar to previous observations by Farci et al. (2000; and unpublished data). A functional analysis of entry and neutralization of variants containing the same HVR1 further corroborated that grouping of full-length E1E2 genomes by HVR1 analysis with subsequent functional analysis of full-length clones is valid and represents the functional properties of the quasispecies population (Fig. S5).

It is conceivable that cell-mediated immune responses also contribute to the differences observed in variants before and after transplantation. Indeed, binding of envelope glycoprotein E2 to CD81 has been suggested to induce functional changes of natural killer or dendritic cells (Nattermann et al., 2006; Crotta et al., 2010). Because of the profound immunosuppression with severely impaired cell-mediated immune response after transplantation, efficient viral entry most likely becomes the predominant determinant of selection of viral variants in the transplanted host. The pretransplantation environment may allow nonselected variants to compete with the selected variants despite disadvantages in terms of neutralizing antibody response and viral entry. In contrast, with immunosuppression after transplantation, which primarily impacts cell-mediated immunity, selected variants take over because efficient viral entry and escape from neutralizing responses give them a relative advantage. This hypothesis is also supported by the experiments in the uPA-SCID mouse model: when the cell-mediated immune system is taken out of the equation, then viral entry becomes an important determinant of relative fitness in the host (Fig. 5). Other factors may also contribute to relative viral fitness, including different replication abilities among HCV variants (Uebelhoer et al., 2008; Dazert et al., 2009) or the ability to spread by cell-cell transmission (Timpe et al., 2008; Witteveldt et al., 2009). Finally, we cannot exclude the idea that mutations that improve viral entry will affect other steps of the viral life cycle.

The association of evasion of host-neutralizing responses and efficient entry may be explained by the fact that viral entry and neutralization are closely linked by the interference of neutralizing antibodies with envelope-host entry factor interactions. Indeed, we have previously shown that purified antiviral antibodies derived from HCV-infected patients inhibit HCV infection at an entry step closely linked to CD81 and SR-BI interaction (Haberstroh et al., 2008). Nevertheless, escape from neutralization could not be explained simply by efficient viral entry because several variants with a high infectivity phenotype were also efficiently neutralized as shown in Figs. 3 and 4 (P01VA, P02VA, P02VD, and P06VD).

Moreover, differences in neutralization remained similar when the amount of HCVpp for neutralization experiments was adjusted for relative infectivity or quantity of pseudoparticles (unpublished data).

Exchange of envelope domains of selected and nonselected HCV variants demonstrated that mutations within the region E2<sub>425–483</sub> mediate enhanced viral entry and escape from neutralizing antibodies. This region contains an important CD81 binding site (Owsianka et al., 2006) and is a target of patient-derived neutralizing antibodies (Haberstroh et al., 2008; Law et al., 2008). Thus, it is likely that the mutations present in this region enhance viral entry by modulating the affinity of E2 to CD81 and induce a conformational change allowing resistance to binding of neutralizing antibodies. Because the exchange of HVR1 of selected and nonselected HCV variants also resulted in a partial enhancement of viral entry (Fig. 6), it is likely that mutations in this region contribute to enhanced entry, e.g., by modulating SR-BI dependency (Bartosch et al., 2005).

It is of interest to note that the mapped E2 region conferring escape from neutralizing antibodies (E2<sub>425–483</sub>) contains an epitope (epitope II, aa 434–446) recognized by host nonneutralizing antibodies that have been proposed to disrupt virus neutralization by antibodies that target epitope I, a highly conserved glycoprotein segment located upstream (aa 412–419; Zhang et al., 2007, 2009). Thus, the mutations identified in this epitope (e.g., H434Q, A444T, and N445H in variant VL; Fig. 6, Fig. S2, and Table S1) may enhance the binding of nonneutralizing antibodies and contribute to attenuation or escape from neutralization of selected variants by antibodies binding to epitope I. However, it is noteworthy that neutralization of the selected variants by our broadly neutralizing mAb AP33 (Fig. 7B), which recognizes amino acid residues located in epitope I (Owsianka et al., 2005; Tarr et al., 2006), was not affected.

Collectively, our data suggest that adaptive mutations within HVR1, CD81 binding domains, and neutralizing epitopes appear during HCV quasispecies evolution after LT, leading to the emergence of the most fit or best adapted virus that is resistant to host autologous neutralizing responses and that is capable of efficient de novo infection of the liver graft. The use of state of the art model systems, including patient-derived HCVpp and naive human hepatocytes from different donors, suggests that the findings obtained indeed mimic virus-host interactions occurring in the initiation of graft infection in the HCV-infected patient. This is further supported by our in vivo experiments investigating viral evolution in the uPA-SCID mouse model repopulated with human hepatocytes and infected with pretransplant serum. The predominant variant which was selected after LT in the respective patient was the most prevalent variant in both plasma and liver of the infected uPA-SCID mouse (Fig. 5). These results demonstrate the relevance of our analysis and validity of the HCVpp model system for HCV infection in vivo. This is in line with the fact that in vitro neutralization in the HCVpp model system has been shown to reflect neutralization of infectious recombinant cell culture-derived HCV in vitro (Lindenbach et al., 2005;

Wakita et al., 2005; Zhong et al., 2005; Haberstroh et al., 2008; von Hahn and Rice, 2008; Krieger et al., 2010) and in human hepatocytes in vivo (Law et al., 2008; Vanwolleghem et al., 2008). Furthermore, the HCVpp system is characterized by high robustness (von Hahn and Rice, 2008; Zeisel et al., 2008) and efficient infection of human hepatocytes (Krieger et al., 2010) and allows the production of a large number of patient-derived viruses. Nevertheless, we cannot exclude the idea that the HCVpp system may or may not mimic all of the complexities of an authentic virus when it comes to neutralization and entry.

Finally, our findings have important implications for the development of novel preventive strategies and management of the HCV-infected patient undergoing LT. It is of interest to note that first generation anti-HCV Ig or antibodies failed to prevent HCV recurrence after LT in clinical trials (Davis et al., 2005; Schiano et al., 2006). The reason why these antibodies failed was most likely their poor neutralizing capacity. Indeed, in vitro and in vivo characterization of anti-E2 HCV-Ab<sup>XTL68</sup> in preclinical experiments had shown an inefficient neutralization in the HCVpp model system and HCV-Trimer mouse model (Eren et al., 2006). Very recent studies in an HCV animal model have shown that new generation cross-neutralizing anti-E2 or anti-CD81 antibodies are capable of neutralizing genetically diverse HCV isolates and protect against heterologous HCV quasispecies challenge (Law et al., 2008; Meuleman et al., 2008). Our study demonstrates for the first time that cross-reactive mAbs neutralize infection of the liver graft by viral variants that are resistant to host-neutralizing responses and as such paves the way for the development of novel preventive strategies and improved management of the HCV-infected patient undergoing LT. Efficient inhibition of infection of diverse HCV escape variants studied here suggests that antireceptor or anti-envelope mAbs will have sufficient cross-reactivity to neutralize highly variable quasispecies variants. Combination of anti-envelope and antireceptor antibodies may further increase the genetic barrier for resistance and may offer a viable and promising strategy to prevent HCV reinfection of the liver graft.

## MATERIALS AND METHODS

**Patients.** Clinical and virological features of patients followed at the Strasbourg University Hospitals are shown in Table I. Blood samples were collected before and 7 d and 1 mo after LT with approval of the Strasbourg University Hospital Institutional Review Board (<http://clinicaltrials.gov> identifier: NCT00213707). Anti-HCV antibodies and HCV RNA were analyzed using AxSYM (Abbott) and VERSANT HCV RNA 3.0 (Bayer).

**Cells and reagents.** 293T cells and Huh7 cells were isolated and cultured as described previously (Pestka et al., 2007; Haberstroh et al., 2008). Primary human hepatocytes from liver resections were provided by P. Bachellier and D. Jaeck (Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France) and isolated by C. Royer (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 748, Strasbourg, France) as described previously (Krieger et al., 2010). Anti-E1 (11B7) and anti-E2 (AP33; 3E5-1) mAbs and human anti-HCV IgG have been described previously (Owsianka et al., 2005; Pestka et al., 2007; Haberstroh et al., 2008). Anti-CD81 (JS81) was obtained from BD.

**Amplification and cloning of HCV E1E2.** Total RNA was purified from 280  $\mu$ l of serum using the RNeasy kit (QIAGEN). cDNA was synthesized using superscript II reverse transcription (Invitrogen) with random primers (Invitrogen). The cDNA was used as the template for PCR amplification of the sequence encoding the C-terminal core and full-length E1E2 proteins using HotStar HiFidelity PCR Taq polymerase (QIAGEN) and primers MLVextS (5'-CGTAGGTCGCGTAACTTGGGTAA-3') and MLVextAS (5'-GTGCGCCTCGGCTCTGGTGATAAAA-3'), corresponding to nt 681–703 and 2886–2909, respectively. A nested PCR was performed using primers AD78-1 and -2 containing an EcoRV restriction site as described previously (Pestka et al., 2007). Full-length E1E2 PCR products were cloned into PCR 2.0-TOPO (Invitrogen). After sequencing (Beckman Coulter), cDNA containing the full-length E1E2 coding sequence was digested by EcoRV and subcloned into expression vector pCMV-IRES for production of HCVpps (Pestka et al., 2007). Phylogenetic analysis of viral quasispecies was performed as described previously (Schvoerer et al., 2007). Neighbor-joining trees based on Kimura two-parameter distance matrices (1,000 bootstrap resampling replications) were constructed using the MEGA 4 software package (Tamura et al., 2007; Schramm et al., 2008). Amino acid genetic diversity was based on the pairwise analysis of all the sequences within each time point.

**HCVpp production, infection, and neutralization.** HCVpps were generated by transfection of 293T cells as described previously (Bartosch et al., 2003; Pestka et al., 2007), using the CMV-Gag-Pol MLV (mouse leukemia virus) packaging construct, an MLV-Luc reporter plasmid, and the expression plasmids encoding the HCV envelope glycoproteins of HCV variants. To study HCV entry, HCVpps were added to Huh7 cells or primary human hepatocytes in triplicate and incubated for 72 h at 37°C. HCV entry was determined by analysis of luciferase reporter gene expression as described previously (von Hahn et al., 2007; Haberstroh et al., 2008). The detection limit for positive luciferase reporter protein expression was  $3 \times 10^3$  RLU/assay corresponding to the mean  $\pm$  3 SD of background levels, i.e., luciferase activity of naive noninfected cells or cells infected with pseudotypes without HCV envelopes (Dimitrova et al., 2008). Background levels of the assay were determined in each individual experiment. For the study of antibody-mediated neutralization, HCVpps were mixed with autologous anti-HCV, anti-E2 mAb AP33, control serum (consisting of a pool of three anti-HCV-negative sera), or irrelevant isotype control IgG and preincubated for 1 h at 37°C and added to Huh7 cells or primary human hepatocytes in triplicate for 72 h at 37°C (von Hahn et al., 2007). Anti-CD81 mAb was preincubated with primary human hepatocytes for 1 h at 37°C, and then HCVpps were added. Antibodies were serially diluted to determine the IC<sub>50</sub>, the concentration of antibody that gave a 50% inhibition of HCVpps. The specific neutralization was determined according to the following equation: specific neutralization =  $100 - [100 \times (\text{infectivity of HCVpps in the presence of autologous serum or mAb/infectivity of HCVpps in the presence of anti-HCV-negative control sera or irrelevant isotype control IgG})]$ . Background levels of HCVpp infection were taken into account by subtracting infectivity in the presence of control serum used at the same dilution as for autologous serum. The neutralization titer was defined as the last dilution of the sample that conveyed a  $\geq 50\%$  reduction of HCVpp entry compared with an equivalent dilution of control serum, as described previously (Pestka et al., 2007). Background of neutralization of HCVpp infection was determined by analysis of a large reference panel of anti-HCV-negative control sera exhibiting a neutralization titer of  $\leq 1:20$ . Thus, a neutralization titer of 1:40 was defined as the threshold of positive antibody-mediated neutralization.

**HCVpp infection of primary human hepatocytes.** Primary human hepatocytes were isolated as described previously (Krieger et al., 2010). Primary hepatocytes were infected with HCVpps expressing envelope glycoproteins of predominant viral isolates described in Fig. 2. 1 d after hepatocyte isolation and plating, hepatocytes were washed, and HCVpps were added for 3 h at 37°C. After infection, the supernatant was removed and replaced by fresh William's E medium. HCVpp infection was assessed by



measurement of luciferase activity 72 h after infection, as described previously (Krieger et al., 2010).

**Analysis of HCVpp envelope glycoprotein expression.** Expression of HCV glycoproteins of predominant strains was characterized in 293T producer cells, and HCVpps were purified by sucrose gradient ultracentrifugation as described previously (Bartosch et al., 2003; Barth et al., 2006; Haberstroh et al., 2008). Immunoblots of HCV glycoproteins were performed using anti-envelope antibodies (anti-E1 mAb 11B7 and anti-E2 mAb AP33 or 3E5-1) or anti-HCV IgG as described previously (Pestka et al., 2007).

**Mapping of envelope domains mediating enhanced entry and escape from neutralization.** For mapping experiments, four major fragments comprising the entire E1E2-coding region were exchanged between the selected variant P01VL and the nonselected variant P01VC of patient P01. These regions included aa 221–483, aa 221–357, aa 358–424, and aa 425–483 and correspond to the functional regions E1, HVR1, HVR2, and CD81 binding domain II, respectively (Fig. 6, A and B). To allow the exchange, new restriction sites were generated by introducing silent mutations using QuikChange II XL (Agilent Technologies). The resulting expression constructs encoding for P01VC/VL chimeric envelope glycoproteins were used to generate HCVpps as described previously (Pestka et al., 2007).

**Infection of uPA-SCID mice transplanted with human hepatocytes.** Human liver-uPA-SCID mice were infected with patient serum (P01), and viral quasispecies were analyzed as described previously (Law et al., 2008; Meuleman et al., 2008).

**Statistical analysis.** Statistical analysis (repeated measures analysis of variance [ANOVA]) was performed with the SPSS 16.0 software for Windows (SPSS Inc.).

**Online supplemental material.** Fig. S1 shows phylogenetic analyses of viral quasispecies evolution in the early phase posttransplantation (day 7 and month 1). Fig. S2 shows comparative alignment of amino acid sequences of full-length E1E2 variants isolated from the six transplanted patients and analyzed in functional experiments. Fig. S3 shows infection of primary human hepatocytes by HCVpps bearing envelope glycoproteins from the most prevalent selected and nonselected strains. Fig. S4 shows expression of envelope glycoproteins in 293T producer cells and HCVpps. Fig. S5 shows functional analysis of subvariants containing the same HVR1 in an individual patient. Online supplemental material is available at <http://www.jem.org/cgi/content/full/jem.20090766/DC1>.

We thank M. Bastien-Valle for excellent technical assistance, P. Bachellier, D. Jaeck, and C. Royer for providing and isolating primary human hepatocytes, N. Meyer for support in statistical analysis, GenImmune, Novartis Vaccines, and Genentech for the gift of antibodies, C. Combet and F. Penin for analyses of envelope sequences, and R. Bartenschlager, J.A. McKeating, M.H. Heim, M.B. Zeisel, E. Schvoerer, C. Rice, D. Samuel, and H.E. Blum for helpful discussions.

This work was supported by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the European Union (ERC-2008-AdG-233130-HEPCENT and Interreg IV FEDER-Hepato-Regio-Net 2009), the Agence Nationale de la Recherche chair of excellence program (ANR-05-CEXC-008), Agence Nationale des Recherches sur le SIDA et les Hépatites Virales (2007/306 and 2008/354), the Région d'Alsace (2007/09), the Else Kröner-Fresenius Foundation (EKFS P17//07//A83/06), the Ligue Contre le Cancer (CA 06/12), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the University of Strasbourg Hospitals, the Ghent University concerted action grant 01G00507, the Belgian state (Interuniversity Attraction Poles Program P6/36-HEPRO), and a fellowship of the Research Foundation Flanders (FWO-Vlaanderen to P. Meuleman).

The authors have no conflicting financial interests.

Submitted: 7 April 2009

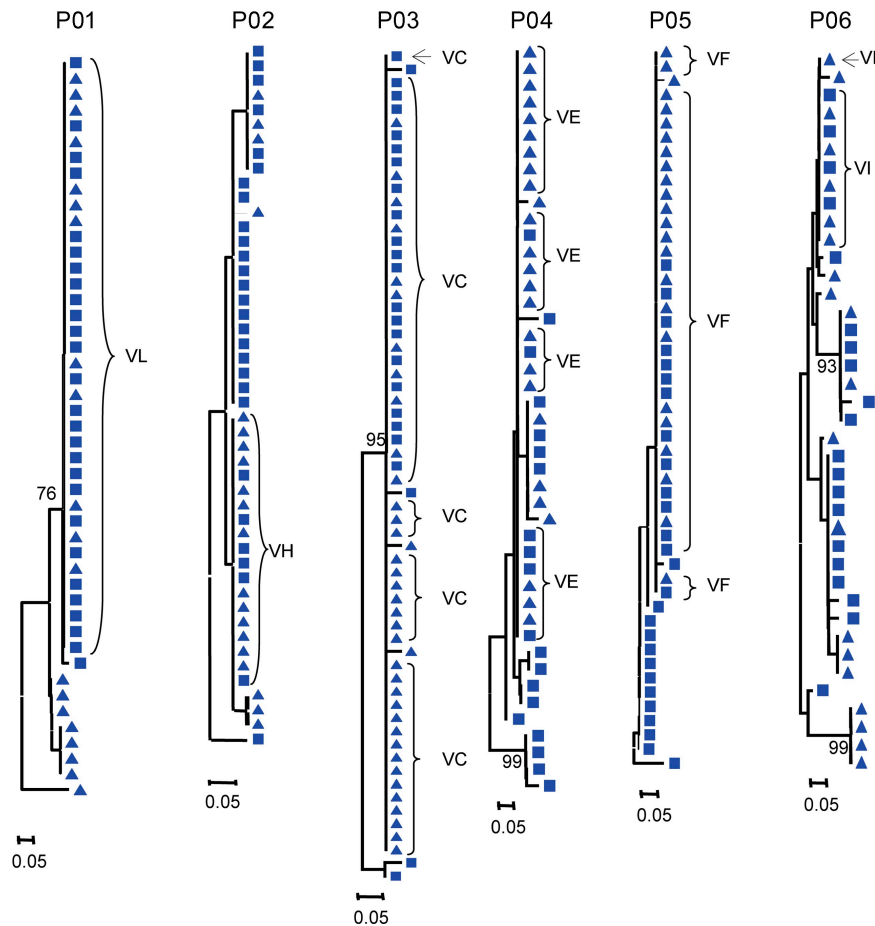
Accepted: 8 July 2010

## REFERENCES

- Aurora, R., M.J. Donlin, N.A. Cannon, and J.E. Tavis. 2009. Genome-wide hepatitis C virus amino acid covariance networks can predict response to antiviral therapy in humans. *J. Clin. Invest.* 119:225–236.
- Barth, H., E.K. Schnober, F. Zhang, R.J. Linhardt, E. Depla, B. Boson, F.L. Cosset, A.H. Patel, H.E. Blum, and T.F. Baumert. 2006. Viral and cellular determinants of the hepatitis C virus envelope-heparan sulfate interaction. *J. Virol.* 80:10579–10590. doi:10.1128/JVI.00941-06
- Bartosch, B., J. Dubuisson, and F.L. Cosset. 2003. Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1–E2 envelope protein complexes. *J. Exp. Med.* 197:633–642. doi:10.1084/jem.20021756
- Bartosch, B., G. Verney, M. Dreux, P. Donot, Y. Morice, F. Penin, J.M. Pawlotsky, D. Lavillette, and F.L. Cosset. 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. doi:10.1128/JVI.79.13.8217-8229.2005
- Bowen, D.G., and C.M. Walker. 2005. Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection. *Nature.* 436:946–952. doi:10.1038/nature04079
- Brown, R.S. 2005. Hepatitis C and liver transplantation. *Nature.* 436:973–978. doi:10.1038/nature04083
- Crotta, S., M. Brazzoli, D. Piccioli, N.M. Valiante, and A. Wack. 2010. Hepatitis C virions subvert natural killer cell activation to generate a cytokine environment permissive for infection. *J. Hepatol.* 52:183–190. doi:10.1016/j.jhep.2009.11.003
- Davis, G.L., D.R. Nelson, N. Terrault, T.L. Pruett, T.D. Schiano, C.V. Fletcher, C.V. Sapan, L.N. Riser, Y. Li, R.J. Whitley, and J.W. Gnanm Jr. 2005. A randomized, open-label study to evaluate the safety and pharmacokinetics of human hepatitis C immune globulin (Civacir) in liver transplant recipients. *Liver Transpl.* 11:941–949. doi:10.1002/lt.20405
- Dazert, E., C. Neumann-Haefelin, S. Bressanelli, K. Fitzmaurice, J. Kort, J. Timm, S. McKiernan, D. Kelleher, N. Gruener, J.E. Tavis, et al. 2009. Loss of viral fitness and cross-recognition by CD8+ T cells limit HCV escape from a protective HLA-B27-restricted human immune response. *J. Clin. Invest.* 119:376–386.
- Dimitrova, M., C. Affolter, F. Meyer, I. Nguyen, D.G. Richard, C. Schuster, R. Bartenschlager, J.C. Voegel, J. Ogier, and T.F. Baumert. 2008. Sustained delivery of siRNAs targeting viral infection by cell-degradable multilayered polyelectrolyte films. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105:16320–16325. doi:10.1073/pnas.0800156105
- Dreux, M., T. Pietschmann, C. Granier, C. Voisset, S. Ricard-Blum, P.E. Mangeot, Z. Keck, S. Foug, N. Vu-Dac, J. Dubuisson, et al. 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. doi:10.1074/jbc.M602706200
- Eren, R., D. Landstein, D. Terkieltaub, O. Nussbaum, A. Zauberman, J. Ben-Porath, J. Gopher, R. Buchnick, R. Kovjazin, Z. Rosenthal-Galili, et al. 2006. Preclinical evaluation of two neutralizing human monoclonal antibodies against hepatitis C virus (HCV): a potential treatment to prevent HCV reinfection in liver transplant patients. *J. Virol.* 80:2654–2664. doi:10.1128/JVI.80.6.2654-2664.2006
- Evans, M.J., T. von Hahn, D.M. Tscherne, A.J. Syder, M. Panis, B. Wölk, T. Hatzioannou, J.A. McKeating, P.D. Bieniasz, and C.M. Rice. 2007. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature.* 446:801–805. doi:10.1038/nature05654
- Farci, P., A. Shimoda, A. Coiana, G. Diaz, G. Peddis, J.C. Melpolder, A. Strazzer, D.Y. Chien, S.J. Munoz, A. Balestrieri, et al. 2000. The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. *Science.* 288:339–344. doi:10.1126/science.288.5464.339
- Feliu, A., E. Gay, M. García-Retortillo, J.C. Saiz, and X. Forns. 2004. Evolution of hepatitis C virus quasispecies immediately following liver transplantation. *Liver Transpl.* 10:1131–1139. doi:10.1002/lt.20206
- Grove, J., S. Nielsen, J. Zhong, M.F. Bassendine, H.E. Drummer, P. Balfe, and J.A. McKeating. 2008. Identification of a residue in hepatitis C virus E2 glycoprotein that determines scavenger receptor BI and CD81 receptor dependency and sensitivity to neutralizing antibodies. *J. Virol.* 82:12020–12029. doi:10.1128/JVI.01569-08

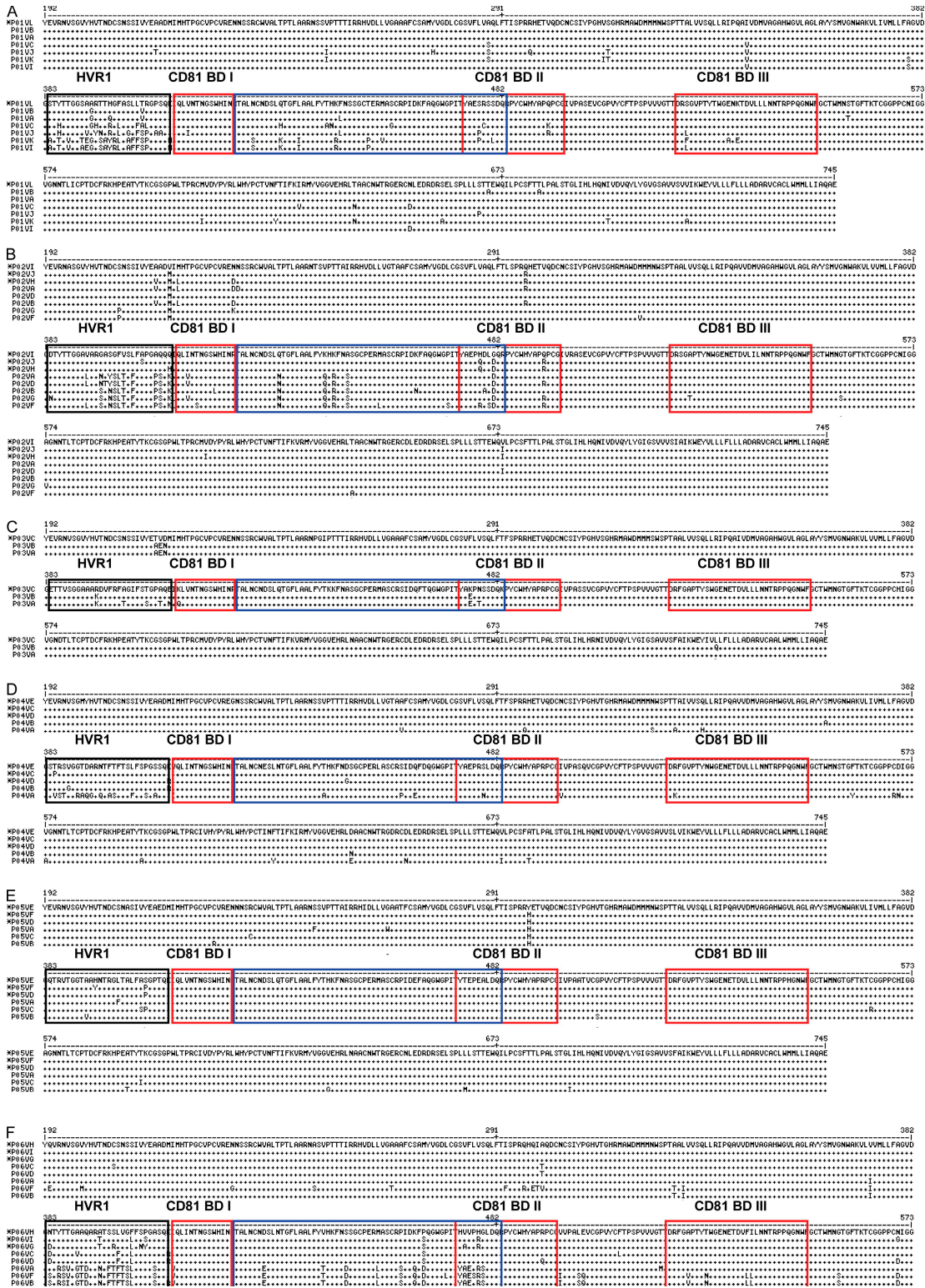
- Haberstroh, A., E.K. Schnober, M.B. Zeisel, P. Carolla, H. Barth, H.E. Blum, F.L. Cosset, G. Koutsoudakis, R. Bartenschlager, A. Union, et al. 2008. Neutralizing host responses in hepatitis C virus infection target viral entry at postbinding steps and membrane fusion. *Gastroenterology*. 135:1719–1728. e1. doi:10.1053/j.gastro.2008.07.018
- Krey, T., J. d'Alayer, C.M. Kikutu, A. Saulnier, L. Damier-Piolle, I. Petitpas, D.X. Johansson, R.G. Tawar, B. Baron, B. Robert, et al. 2010. The disulfide bonds in glycoprotein E2 of hepatitis C virus reveal the tertiary organization of the molecule. *PLoS Pathog.* 6:e1000762. doi:10.1371/journal.ppat.1000762
- Krieger, S.E., M.B. Zeisel, C. Davis, C. Thumann, H.J. Harris, E.K. Schnober, C. Mee, E. Soulier, C. Royer, M. Lambotin, et al. 2010. Inhibition of hepatitis C virus infection by anti-claudin-1 antibodies is mediated by neutralization of E2-CD81-claudin-1 associations. *Hepatology*. 51:1144–1157.
- Lavillette, D., Y. Morice, G. Germanidis, P. Donot, A. Soulier, E. Pagkalos, G. Sakellariou, L. Intrator, B. Bartosch, J.M. Pawlotsky, and F.L. Cosset. 2005. Human serum facilitates hepatitis C virus infection, and neutralizing responses inversely correlate with viral replication kinetics at the acute phase of hepatitis C virus infection. *J. Virol.* 79:6023–6034. doi:10.1128/JVI.79.10.6023-6034.2005
- Law, M., T. Maruyama, J. Lewis, E. Giang, A.W. Tarr, Z. Stamataki, P. Gastaminza, F.V. Chisari, I.M. Jones, R.I. Fox, et al. 2008. Broadly neutralizing antibodies protect against hepatitis C virus quasispecies challenge. *Nat. Med.* 14:25–27. doi:10.1038/nm1698
- Lindenbach, B.D., M.J. Evans, A.J. Syder, B. Wölk, T.L. Tellinghuisen, C.C. Liu, T. Maruyama, R.O. Hynes, D.R. Burton, J.A. McKeating, and C.M. Rice. 2005. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science*. 309:623–626. doi:10.1126/science.1114016
- Meuleman, P., J. Hesselgesser, M. Paulson, T. Vanwolleghem, I. Desombere, H. Reiser, and G. Leroux-Roels. 2008. Anti-CD81 antibodies can prevent a hepatitis C virus infection in vivo. *Hepatology*. 48:1761–1768. doi:10.1002/hep.22547
- Moreno Garcia, J., S. del Campo Terron, G. Moraleda Garcia, M. Garcia Gonzalez, E. de Vicente Lopez, J. Nuño Vazquez-Garza, J. Fortun Abete, P. Martin, and R. Barcena Marugan. 2003. Analysis of hepatitis C viral quasispecies in liver transplantation. *Transplant. Proc.* 35:1838–1840. doi:10.1016/S0041-1345(03)00632-8
- Nattermann, J., H. Zimmermann, A. Iwan, M. von Lilienfeld-Toal, L. Leifeld, H.D. Nischalke, B. Langhans, T. Sauerbruch, and U. Spengler. 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. doi:10.1002/hep.21350
- Owsianka, A., A.W. Tarr, V.S. Jutla, D. Lavillette, B. Bartosch, F.L. Cosset, J.K. Ball, and A.H. Patel. 2005. Monoclonal antibody AP33 defines a broadly neutralizing epitope on the hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein. *J. Virol.* 79:11095–11104. doi:10.1128/JVI.79.17.11095-11104.2005
- Owsianka, A.M., J.M. Timms, A.W. Tarr, R.J. Brown, T.P. Hickling, A. Szejek, K. Bienkowska-Szewczyk, B.J. Thomson, A.H. Patel, and J.K. Ball. 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. doi:10.1128/JVI.00271-06
- Pestka, J.M., M.B. Zeisel, E. Bläser, P. Schürmann, B. Bartosch, F.L. Cosset, A.H. Patel, H. Meisel, J. Baumert, S. Viazov, et al. 2007. Rapid induction of virus-neutralizing antibodies and viral clearance in a single-source outbreak of hepatitis C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 104:6025–6030. doi:10.1073/pnas.0607026104
- Pileri, P., Y. Uematsu, S. Campagnoli, G. Galli, F. Falugi, R. Petracca, A.J. Weiner, M. Houghton, D. Rosa, G. Grandi, and S. Abrignani. 1998. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science*. 282:938–941. doi:10.1126/science.282.5390.938
- Ploss, A., M.J. Evans, V.A. Gaysinskaya, M. Panis, H. You, Y.P. de Jong, and C.M. Rice. 2009. Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature*. 457:882–886. doi:10.1038/nature07684
- Ray, S.C., L. Fanning, X.H. Wang, D.M. Netski, E. Kenny-Walsh, and D.L. Thomas. 2005. Divergent and convergent evolution after a common-source outbreak of hepatitis C virus. *J. Exp. Med.* 201:1753–1759. doi:10.1084/jem.20050122
- Schiano, T.D., M. Charlton, Z. Younossi, E. Galun, T. Pruetz, R. Tur-Kaspa, R. Eren, S. Dagan, N. Graham, P.V. Williams, and J. Andrews. 2006. Monoclonal antibody HCV-AbXTL68 in patients undergoing liver transplantation for HCV: results of a phase 2 randomized study. *Liver Transpl.* 12:1381–1389. doi:10.1002/lt.20876
- Schramm, F., E. Soulier, C. Royer, T. Weitten, S. Fafi-Kremer, N. Brignon, N. Meyer, B. Ellero, M.L. Woehl-Jaegle, C. Meyer, et al. 2008. Frequent compartmentalization of hepatitis C virus with leukocyte-related amino acids in the setting of liver transplantation. *J. Infect. Dis.* 198:1656–1666. doi:10.1086/592986
- Schvoerer, E., E. Soulier, C. Royer, A.C. Renaudin, C. Thumann, S. Fafi-Kremer, N. Brignon, S. Doridot, N. Meyer, P. Pinson, et al. 2007. Early evolution of hepatitis C virus (HCV) quasispecies after liver transplant for HCV-related disease. *J. Infect. Dis.* 196:528–536. doi:10.1086/519691
- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei, and S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24:1596–1599. doi:10.1093/molbev/msm092
- Tarr, A.W., A.M. Owsianka, J.M. Timms, C.P. McClure, R.J. Brown, T.P. Hickling, T. Pietschmann, R. Bartenschlager, A.H. Patel, and J.K. Ball. 2006. Characterization of the hepatitis C virus E2 epitope defined by the broadly neutralizing monoclonal antibody AP33. *Hepatology*. 43:592–601. doi:10.1002/hep.21088
- Timpe, J.M., Z. Stamataki, A. Jennings, K. Hu, M.J. Farquhar, H.J. Harris, A. Schwarz, I. Desombere, G.L. Roels, P. Balfe, and J.A. McKeating. 2008. Hepatitis C virus cell-cell transmission in hepatoma cells in the presence of neutralizing antibodies. *Hepatology*. 47:17–24. doi:10.1002/hep.21959
- Uebelhoefer, L., J.H. Han, B. Callendret, G. Mateu, N.H. Shoukry, H.L. Hanson, C.M. Rice, C.M. Walker, and A. Grakoui. 2008. Stable cytotoxic T cell escape mutation in hepatitis C virus is linked to maintenance of viral fitness. *PLoS Pathog.* 4:e1000143. doi:10.1371/journal.ppat.1000143
- Vanwolleghem, T., J. Bukh, P. Meuleman, I. Desombere, J.C. Meunier, H. Alter, R.H. Purcell, and G. Leroux-Roels. 2008. Polyclonal immunoglobulins from a chronic hepatitis C virus patient protect human liver-chimeric mice from infection with a homologous hepatitis C virus strain. *Hepatology*. 47:1846–1855. doi:10.1002/hep.22244
- von Hahn, T., and C.M. Rice. 2008. Hepatitis C virus entry. *J. Biol. Chem.* 283:3689–3693. doi:10.1074/jbc.R700024200
- von Hahn, T., J.C. Yoon, H. Alter, C.M. Rice, B. Rehmann, P. Balfe, and J.A. McKeating. 2007. Hepatitis C virus continuously escapes from neutralizing antibody and T-cell responses during chronic infection in vivo. *Gastroenterology*. 132:667–678. doi:10.1053/j.gastro.2006.12.008
- Wakita, T., T. Pietschmann, T. Kato, T. Date, M. Miyamoto, Z. Zhao, K. Murthy, A. Habermann, H.G. Kräusslich, M. Mizokami, et al. 2005. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat. Med.* 11:791–796. doi:10.1038/nm1268
- Witteveldt, J., M.J. Evans, J. Bitzegeio, G. Koutsoudakis, A.M. Owsianka, A.G. Angus, Z.Y. Keck, S.K. Fong, T. Pietschmann, C.M. Rice, and A.H. Patel. 2009. CD81 is dispensable for hepatitis C virus cell-to-cell transmission in hepatoma cells. *J. Gen. Virol.* 90:48–58. doi:10.1099/vir.0.006700-0
- Zeisel, M.B., G. Koutsoudakis, E.K. Schnober, A. Haberstroh, H.E. Blum, F.L. Cosset, T. Wakita, D. Jaeck, M. Doffoel, C. Royer, et al. 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. doi:10.1002/hep.21994
- Zeisel, M.B., F.L. Cosset, and T.F. Baumert. 2008. Host neutralizing responses and pathogenesis of hepatitis C virus infection. *Hepatology*. 48:299–307. doi:10.1002/hep.22307
- Zhang, P., C.G. Wu, K. Mihalik, M.L. Virata-Theimer, M.Y. Yu, H.J. Alter, and S.M. Feinstone. 2007. Hepatitis C virus epitope-specific neutralizing antibodies in Igs prepared from human plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 104:8449–8454. doi:10.1073/pnas.0703039104
- Zhang, P., L. Zhong, E.B. Struble, H. Watanabe, A. Kachko, K. Mihalik, M.L. Virata-Theimer, H.J. Alter, S. Feinstone, and M. Major. 2009. Depletion of interfering antibodies in chronic hepatitis C patients and vaccinated chimpanzees reveals broad cross-genotype neutralizing activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 106:7537–7541. doi:10.1073/pnas.0902749106
- Zhong, J., P. Gastaminza, G. Cheng, S. Kapadia, T. Kato, D.R. Burton, S.F. Wieland, S.L. Uprichard, T. Wakita, and F.V. Chisari. 2005. Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 102:9294–9299. doi:10.1073/pnas.0503596102

## SUPPLEMENTAL MATERIAL

Fafi-Kremer et al., <http://www.jem.org/cgi/content/full/jem.20090766/DC1>

**Figure S1. Phylogenetic analyses of viral quasispecies evolution in the early phase after transplantation (day 7 and month 1).** Rooted neighbor-joining trees of HCV HVR1 amino acid sequences from the six patients depicted in Table I are shown. Bootstrap values are expressed as percentages per 1,000 replicates. Only bootstrap proportions >70 are indicated. The predominant viral variants are indicated in capital letters. Sequences isolated 7 d after LT (blue squares) and sequences isolated 1 mo after LT (blue triangles) are shown. Viral strains analyzed in functional experiments (Figs. 2–4) are indicated within the trees.

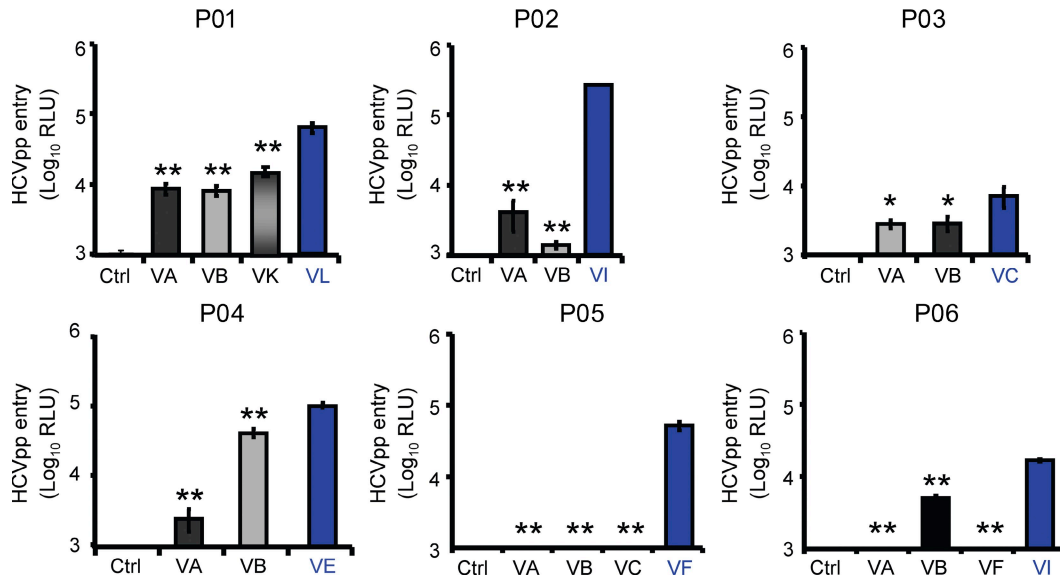




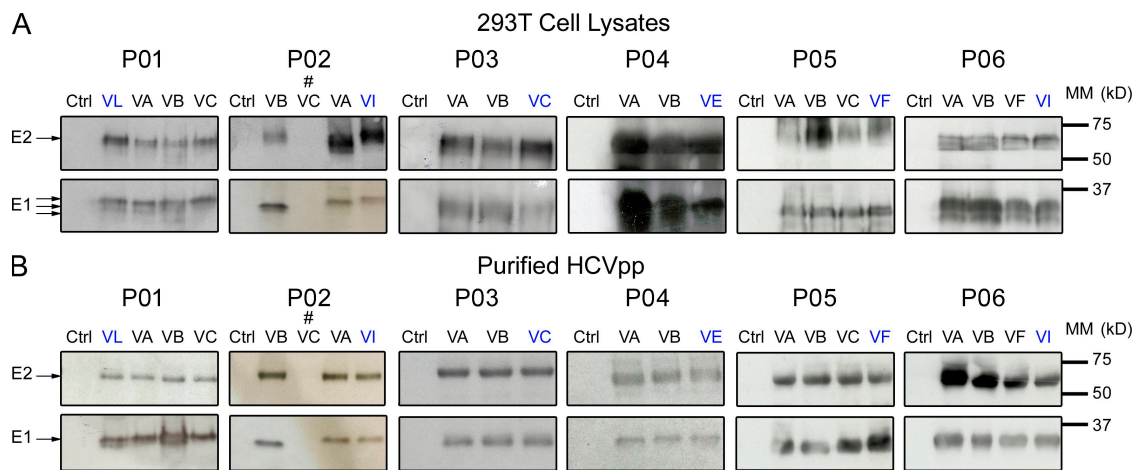
Downloaded from jem.rupress.org on December 17, 2010

**Figure S2. Comparative alignment of amino acid sequences of full-length E1E2 variants isolated from the six transplanted patients and analyzed in functional experiments.** (A–F) Deduced amino acid sequences of E1E2 variants isolated from patients 01 (A), 02 (B), 03 (C), 04 (D), 05 (E), and 06 (F) are shown. Crosses (+) indicate identity with the amino acid sequence of the most prevalent selected variant of each patient (top strain). Mutations are indicated by a letter. Defective clones with stop codons or insertion/deletions altering the open reading frame are not depicted. Selected variants with a high level entry phenotype are indicated by an asterisk. Amino acid sequences encompassing HVR1 (black boxes), CD81 binding domains (BD) I, II, and III (red boxes; Owsianka et al., 2006), and the E2 region comprising aa 425–483 (blue boxes) are highlighted.

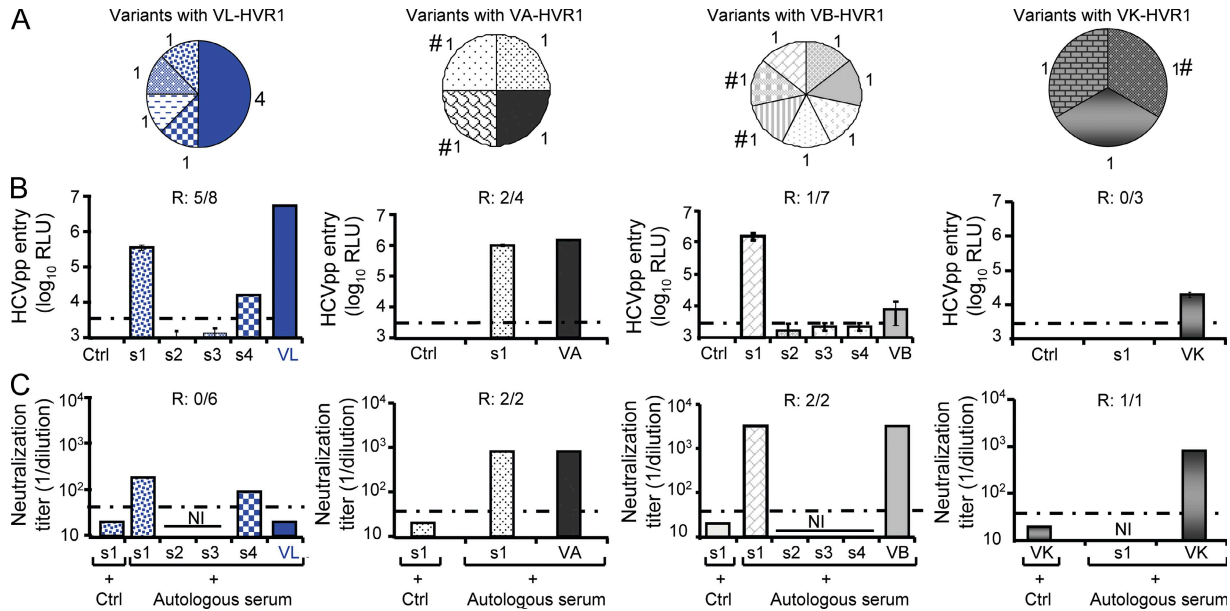




**Figure S3. Infection of primary human hepatocytes by HCVpps bearing envelope glycoproteins from the most prevalent selected and non-selected strains.** Human hepatocytes were obtained from four different donors. Infection of HCVpps derived from the most prevalent selected and non-selected variants from each patient was studied as described for Huh7 cells (see Fig. 3). Results are expressed in relative light units (RLU) plotted in a logarithmic scale. The detection limit for positive luciferase reporter protein expression was  $3 \times 10^3$  RLU/assay, corresponding to the mean  $\pm$  3 SD of background levels, i.e., luciferase activity of naive noninfected cells or cells infected with pseudotypes without HCV envelopes (Dimitrova et al., 2008). Background levels of the assay were determined in each experiment. Means  $\pm$  SD from one representative experiment (performed in triplicate) out of four independent experiments are shown. Statistically significant differences (repeated measures ANOVA) in HCVpp entry between the major selected strain and nonselected strains are indicated by asterisks (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.001$ ). Ctrl, negative control.



**Figure S4. Expression of envelope glycoproteins in 293T producer cells and HCVpps.** Envelope glycoprotein expression of the most prevalent variants re-infecting the liver graft (selected variants P01VL, P02VI, P03VC, P04VE, P05VF, and P06VI; Fig. 2) and variants not detected after transplantation is shown. One variant (P02VC) containing a stop codon in the HCV open reading frame, depicted with a number sign (#), was used as an internal control. (A) E1E2 expression was analyzed by immunoblotting of lysates of 293T cells transfected with E1E2 expression constructs using anti-E1, anti-E2, or human anti-HCV IgG. (B) Expression of envelope glycoproteins E1 and E2 on sucrose gradient-purified HCVpps. HCVpps were produced and purified from viral isolates depicted in A as described in Materials and methods. Purified HCVpps were subjected to immunoblot as described in A. The positions of the molecular markers in kilodaltons are shown on the right side, and envelope glycoproteins are shown on the left side. Ctrl, negative control; MM, molecular mass.



**Figure S5. Functional analysis of subvariants containing the same HVR1.** (A) Distribution of HCV subvariants in patient 01 based on E1E2 amino acid sequences. Full-length E1E2 subvariants of each HVR1 variant group VA, VB, VK, and VL (Fig. 2) of P01 were cloned, sequenced, and aligned. Circle graphs represent the percentage of each clone detected. Variants containing stop codons, insertions, or deletions altering the HCV open reading frame are depicted with a number sign (#). The number of each clone is indicated. Individual full-length E1E2 subvariants are indicated by an individual pattern and/or grayscale. The selected subvariant after transplantation is depicted in blue, and nonselected subvariants not detected after transplantation are depicted in white, gray, or black. (B) Comparative analysis of entry of HCVpps containing the envelope proteins from the selected and nonselected E1E2 subvariants (s) in Huh7 cells. Results are expressed in relative light units (RLU) plotted in a logarithmic scale. The threshold for a detectable infection in this system was  $3 \times 10^3$  RLU, indicated by dashed lines, and was determined as described in Materials and methods. Means  $\pm$  SD from at least four independent experiments performed in triplicate are shown. The ratio (R) of highly infectious subvariants compared with the less infectious ones of each HVR1 group is indicated. (C) Neutralization of infectious HCVpps shown in B by autologous pretransplant serum. End point dilution titers are indicated for each E1E2 subvariant. Dashed lines indicate the threshold for a positive neutralization titer (1:40). Calculation of neutralization and determination of threshold titers are described in Materials and methods. The ratio of highly neutralized subvariants compared with poorly or nonneutralized variants (neutralization titer  $\leq 1:200$ ) is indicated. Entry and neutralization of the selected E1E2 subvariant are depicted in blue, and entry and neutralization of nonselected variants is depicted in white, gray, or black. Ctrl, negative control; NI, noninfectious.

**Table S1.** Amino acid changes of viral variants in E2 region comprising aa 425–483

Viral variants	Mapping E2 <sub>425–483</sub> region, amino acid positions																							
	Epitope II										CD81 BDII													
	428	431	434	438	444	445	446	447	449	453	456	458	461	464	466	471	474	475	476	477	478	479	480	481
P01VL <sup>a</sup>	N	D	Q	L	T	H	K	F	S	T	M	S	P	K	A	P	Y	A	E	S	R	S	S	D
P01VB <sup>b</sup>																								
P01VA <sup>b</sup>								L																
P01VC <sup>b</sup>			H		A	N					G										C			
P01VI <sup>b</sup>	S		K	I			R			P														
P01VK <sup>b</sup>	S		K	I			R			P	V								P				L	
P01VJ <sup>c</sup>								L											P					
P02VI <sup>a</sup>	N	D	Q	L	K	H	K	F	A	P	M	S	P	K	A	P	Y	A	E	P	H	D	L	G
P02VJ <sup>a</sup>																					Q			D
P02VH <sup>a</sup>																					Q			D
P02VA <sup>b</sup>			N		Q		R		S															D
P02VB <sup>b</sup>			N		Q		R		S				N									A		D
P02VD <sup>b</sup>			N		Q		R		S															D
P02VF <sup>c</sup>			N		Q		R		S		L					S					R		S	D
P02VG <sup>c</sup>			N		Q		R		S															D
P03VC <sup>a</sup>	N	D	Q	L	T	K	K	F	A	P	M	S	S	Q	T	P	Y	A	K	P	N	S	S	D
P03VA <sup>b</sup>																			E		T			
P03VB <sup>b</sup>																			E					
P04VE <sup>a</sup>	N	E	N	L	T	H	K	F	D	P	L	S	S	Q	D	P	Y	A	E	P	R	S	L	D
P04VD <sup>a</sup>									G															
P04VC <sup>a</sup>																								
P04VA <sup>b</sup>					A								P	E								N		
P04VB <sup>b</sup>																								
P05VE <sup>a</sup>	N	D	N	L	T	H	K	F	A	P	M	S	P	E	A	P	Y	T	E	P	E	A	L	D
P05VF <sup>a</sup>																								
P05VD <sup>a</sup>																								
P05VA <sup>c</sup>																								
P05VB <sup>c</sup>																								
P05VC <sup>c</sup>																								
P06VH <sup>a</sup>	N	D	N	L	V	H	K	F	S	P	M	S	P	K	P	P	H	V	V	P	H	G	L	D
P06VI <sup>a</sup>															S							R		
P06VG <sup>a</sup>															S			A				R		
P06VD <sup>b</sup>															S									
P06VF <sup>b</sup>		E			T				D		L		S	Q	D	L	Y	A	E	S	R	S		
P06VA <sup>c</sup>		E			T				D		L		S	Q	D		Y	A	E		R	S		
P06VB <sup>c</sup>		E			T				D		L		S	Q	D		Y	A	E		R	S		
P06VC <sup>c</sup>															S									

BD, binding domain. For each patient, amino acid changes in the E2 region encompassing aa 425–483 relative to the most prevalent variant showing efficient viral entry and escape from neutralizing antibodies are indicated. Epitope II (Zhang et al., 2007, 2009) and CD81 BDII (Owsianka et al., 2006) are indicated. Amino acid positions where at least one mutation was observed in the six patients are shown; conserved amino acid positions are not depicted.

<sup>a</sup>Infectious variants resistant to neutralization.

<sup>b</sup>Infectious variants efficiently neutralized.

<sup>c</sup>Noninfectious variants.

## REFERENCES

- Dimitrova, M., C. Affolter, F. Meyer, I. Nguyen, D.G. Richard, C. Schuster, R. Bartenschlager, J.C. Voegel, J. Ogier, and T.F. Baumert. 2008. Sustained delivery of siRNAs targeting viral infection by cell-degradable multilayered polyelectrolyte films. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 105:16320–16325. doi:10.1073/pnas.0800156105
- Owsianka, A.M., J.M. Timms, A.W. Tarr, R.J. Brown, T.P. Hickling, A. Szwejk, K. Bienkowska-Szewczyk, B.J. Thomson, A.H. Patel, and J.K. Ball. 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. doi:10.1128/JVI.00271-06
- Zhang, P., C.G. Wu, K. Mihalik, M.L. Virata-Theimer, M.Y. Yu, H.J. Alter, and S.M. Feinstone. 2007. Hepatitis C virus epitope-specific neutralizing antibodies in Igs prepared from human plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 104:8449–8454. doi:10.1073/pnas.0703039104
- Zhang, P., L. Zhong, E.B. Struble, H. Watanabe, A. Kachko, K. Mihalik, M.L. Virata-Theimer, H.J. Alter, S. Feinstone, and M. Major. 2009. Depletion of interfering antibodies in chronic hepatitis C patients and vaccinated chimpanzees reveals broad cross-genotype neutralizing activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 106:7537–7541. doi:10.1073/pnas.0902749106

## **PARTIE II:**

# **ANALYSE DES MECANISMES MOLECULAIRES IMPLIQUES DANS L'INFECTIOSITE ET DANS L'ECHAPPEMENT AUX ANTICORPS NEUTRALISANTS LORS DE LA TRANSPLANTATION HEPATIQUE**

### **Publication n°2**

## **Molecular mechanisms of viral evasion in acute hepatitis C virus liver graft infection**

*soumis*

---

Par le travail précédent, nous avons montré que l'infectiosité et l'échappement aux anticorps neutralisants sont des facteurs importants dans la sélection de variants viraux lors de la transplantation hépatique. Nous avons identifié la région dans la glycoprotéine E2 responsable de cette infectiosité accrue et de cet échappement à la neutralisation (425-483 aa). La suite logique de ce travail a été d'étudier le rôle fonctionnel des mutations présentes dans cette région, à la fois dans le pouvoir infectieux et dans l'échappement aux anticorps neutralisants. Nous avons travaillé sur deux variants d'un même patient (le patient P01) présentant de fortes différences dans l'entrée et dans la neutralisation. Par mutagenèse dirigée, nous avons identifié deux mutations (G458S et C478R) responsables du phénotype du variant sélectionné. Ces mutations augmentent l'entrée virale en modulant de manière marquée la dépendance à CD81, l'un des facteurs d'entrée du VHC. Au contraire, la dépendance des variants chimères aux autres facteurs d'entrée, SR-BI et les protéines de jonctions CLDN1 et OCLN est faiblement affectée. Des études fonctionnelles utilisant un large panel d'anticorps monoclonaux ont montrée que ces mutations faisaient partie d'un épitope responsable de l'échappement viral lors de l'infection du greffon hépatique. De plus, nous avons montré que les mutations induisent une résistance à la

neutralisation par des sérums hétérologues de patients chroniquement infectés. Ces résultats suggèrent que ces mutations pourraient jouer un rôle important dans l'échappement viral en général.

L'ensemble de ces données permet d'approfondir la connaissance des mécanismes moléculaires de l'échappement viral lors de l'infection aiguë du greffon hépatique et représente un premier pas pour le développement de stratégies préventives antivirales ciblant les interactions entre les glycoprotéines d'enveloppe et les facteurs d'entrée cellulaires du VHC.

# **Molecular mechanisms of viral evasion in acute hepatitis C virus liver graft infection**

## **Cell entry factor usage and viral evasion in HCV infection**

Patric Carolla<sup>1,2\*</sup>, Isabel Fofana<sup>1,2\*</sup>, Samira Fafi-Kremer<sup>1,2,3</sup>, Muhammad Nauman Zahid<sup>1,2</sup>, Karine Cury<sup>1,2</sup>, Marine Turek<sup>1,2</sup>, Michèle Bastien-Valle<sup>1,2</sup>, François-Loïc Cosset<sup>4</sup>, Thomas Pietschmann<sup>5</sup>, Juliette Hayer<sup>6</sup>, Christophe Combet<sup>6</sup>, François Habersetzer<sup>1,2,7</sup>, Michel Doffoël<sup>1,2,7</sup>, Zhen-Yong Keck<sup>8</sup>, Steven K.H. Fong<sup>8</sup>, Mirjam B. Zeisel<sup>1,2</sup>, Françoise Stoll-Keller<sup>1,2,3</sup>, Thomas F. Baumert<sup>1,2,7,\*\*</sup>

<sup>1</sup>Inserm, U748, 67000 Strasbourg, France, <sup>2</sup>Université de Strasbourg, 67000 Strasbourg, France, <sup>3</sup>Laboratoire de Virologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, 67000 Strasbourg, France, <sup>4</sup>Inserm, U758, ENS Lyon, 69364 Lyon, France, <sup>5</sup>Division of Experimental Virology, TWINCORE, Centre for Experimental and Clinical Infection Research, a joint venture between the Medical School Hannover and the Helmholtz Centre for Infection Research, 30625 Hannover, Germany, <sup>6</sup>Pôle Rhône-Alpes de BioInformatique, UMR 5056, CNRS, Université de Lyon, Institut de Biologie et Chimie des Proteines, 69367 Lyon, France, <sup>7</sup>Pôle Hepato-digestif, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, 67000 Strasbourg, France, <sup>8</sup>Department of Pathology, Stanford University School of Medicine, Stanford, 94304 California, USA

\* P. C. and I. F. contributed equally to this work

The authors declare no conflict of interest.

Text: 51 056 characters; 7 Figures

**\*\*Corresponding author:** Thomas F. Baumert, M.D., Inserm Unit 748, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, 3 rue Koeberlé, F-67000 Strasbourg, France; phone: (33) 3 68 85 37 02; fax: (33) 3 68 85 37 50, e-mail: Thomas.Baumert@unistra.fr

**Abbreviations:** CLDN - claudin; CTRL - control; HCC - hepatocellular carcinoma; HCV - hepatitis C virus; HCVpp - HCV pseudoparticles; HMAb - human monoclonal antibody; IgG - immune globulin G; mAb - monoclonal antibody; RLU - relative light units; SR-BI - scavenger receptor class B type I; LT - Liver transplantation; OCLN - occludin.

**Financial support:** This work was supported by Inserm, the European Union (ERC-2008-AdG-233130-HEPCENT and Interreg IV FEDER-Hepato-Regio-Net 2009), the ANR chair of excellence program (ANR-05-CEXC-008), ANRS (2007/306 and 2008/354), the Région d'Alsace (2007/09), the Else Kröner-Fresenius Stiftung (EKFS P17//07//A83/06), the Ligue Contre le Cancer (CA 06/12/08), INCA (2009-143) and Canceropôle du Grand-Est (30/03/09), the Finovi Foundation, the IBISA GIS, the French Research Ministry and PHS grants HL079381 and AI081903 to SKHF.



## **SUMMARY**

**Hepatitis C virus entry is the first step of viral infection and a key target of host neutralizing responses. We have recently demonstrated that enhanced viral entry and escape from antibody-mediated neutralization are important determinants for selection of viral variants during liver transplantation. However, the molecular mechanisms of viral evasion in acute liver graft infection are only poorly understood. Using reverse genetics and functional analyses of patient-derived escape variants we identified two positions (458 and 478) in HCV envelope glycoprotein E2 mediating enhanced viral entry by modulating CD81 receptor dependency. Neutralization assays demonstrate that the two positions confer resistance to neutralization of antibodies in acute graft infection and in chronically infected patients. We demonstrate that the identified positions are part of a conformational neutralizing epitope modulating E2-CD81 interactions at an entry step occurring post particle binding. In conclusion, our findings identify a novel and clinically important viral escape mechanism, where co-evolution simultaneously occurs between CD81 usage and escape from neutralization. The identification of this mechanism advances our understanding of viral evasion in HCV infection and paves the way for the development of novel antiviral strategies targeting envelope glycoprotein-host entry factor interactions.**

## INTRODUCTION

Chronic hepatitis C virus (HCV) infection is a major cause of liver disease including liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC) (Alter 2006) which are leading indications for liver transplantation (LT) (Brown 2005). The major limitation of LT is the universal re-infection of the liver graft (Brown 2005). The absence of a prophylactic strategy to prevent re-infection, the poor tolerability and efficacy of antiviral interferon-based therapies in LT recipients (Brown 2005; Berenguer 2008) demonstrate the urgent medical need to develop novel antiviral strategies.

Only a small fraction of viral variants present before transplantation persists after LT (Fafi-Kremer et al. 2010). The re-infection of the liver graft occurs despite the presence of anti-HCV antibodies suggesting that HCV has developed strategies to (i) adapt rapidly to the new host environment and (ii) evade host humoral responses. The molecular mechanisms by which the virus evades host immunity to re-infect the liver graft are unknown. We have previously demonstrated that enhanced viral entry and escape from antibody-mediated neutralization are important determinants for the selection of viral variants following LT (Fafi-Kremer et al. 2010). In a longitudinal analysis of six HCV-infected patients undergoing LT, we have shown that HCV variants re-infecting the liver graft were characterized by efficient entry and poor neutralization by antibodies present in pre-transplant serum compared to variants not detected following transplantation (Fafi-Kremer et al. 2010).

Viral entry is mediated by at least four host factors including CD81 (Pileri et al. 1998), scavenger receptor class B type I (SR-BI) (Scarselli et al. 2002) and tight junction proteins claudin-1 (CLDN1) (Evans et al. 2007) and occludin (OCLN) (Ploss et al. 2009). However, the role of these molecules for viral escape during acute graft infection is unknown. Mapping studies had indicated that an envelope glycoprotein region comprising amino acids 425-483 and covering hypervariable region 2 (HVR2) most likely contained the mutations responsible for the phenotype of enhanced entry and viral evasion of variants re-infecting the liver graft (Fafi-Kremer et al. 2010).

In this study, we aimed to uncover the molecular mechanisms of re-infection of the liver graft. To identify viral and host factors mediating enhanced viral entry and evasion from immune responses in acute graft infection, we performed reverse genetics in two prototype variants derived from a well characterized patient (P01) undergoing LT (Fafi-Kremer et al. 2010). One variant, termed P01 VL, had re-infected the liver graft and was characterized by a high infectivity and resistance to

neutralizing antibodies (Fafi-Kremer et al. 2010). The other variant, termed P01 VC, disappeared following graft infection and was characterized by poor infectivity and high sensitivity to neutralization by pre-transplant serum (Fafi-Kremer et al. 2010).

## RESULTS

**HCV E2 residues at positions 458 and 478 confer enhanced viral entry of a high-infectivity variant re-infecting the liver graft.** To identify the mutations involved in the phenotype of viral variants, we introduced individual mutations of envelope glycoprotein region comprising amino acids 425-483 (Fafi-Kremer et al. 2010) of the low entry and neutralization sensitive mutant VC into the highly infectious escape variant VL (Fig. 1A). Previous studies had indicated that this region most likely contained the mutations responsible for the phenotype of enhanced entry of the VL strain (Fafi-Kremer et al. 2010). The chimeric E1E2 cDNAs were used to produce infectious HCVpp. Following adjustment of pseudoparticle levels by normalization of lentiviral p24 antigen expression, viral entry levels were quantified in comparison to the phenotype of the escape variant VL. As shown in Fig. 1B, the relative level of entry of the nonselected variant VC was 5% compared to the escape variant VL. By introducing the mutations S458G and R478C into the cDNA of the VC strain, chimeric HCVpp showed similar viral entry level as the paternal variant VL whereas the introduction of individual or combination of other mutations only had a partial effect. These results confirm that the combination of mutations S458G and R478C are largely responsible for the high infectivity of the escape variant VL.

**Differences in viral entry are not due to impaired envelope expression or envelope glycoprotein binding to Huh7.5.1 cells.** To address whether substitutions at position 458 and 478 alter viral entry through variations by expression of envelope glycoproteins or assembly of HCVpp, we assessed E1E2 expression on sucrose cushion purified HCVpp by immunoblot. Since the levels of envelope glycoprotein incorporation into HCVpp and lentiviral p24 antigen expression were similar for both strains (Fig. 2A-D), it is unlikely that the differences in viral entry are the result of impaired HCVpp assembly or release. To assess whether the mutations alter viral entry by modulating viral binding to the host cells, we investigated binding of wild-type and mutant envelope glycoproteins to Huh7 cells using flow cytometry (Fig. 2E). The validity of the assay was confirmed by dose-dependent cellular binding

of envelope glycoproteins derived from strains H77 and HCV-J (Fig. 2F). Since cellular binding of parental and chimeric glycoproteins was similar, it is unlikely that differences in viral entry are due to differences in viral attachment.

**Enhanced viral entry by mutations S458G and R478C of the escape variant is the result of altered use of CD81.** To address whether the mutations affect viral entry by different usage of cell entry factors CD81, SR-BI, CLDN1 and OCLN, we produced cell lines stably overexpressing individually the four main cell entry factors in Huh7.5.1 cells. Using these cell lines, we then studied viral entry of HCVpp derived from parental and chimeric variants. The relative overexpression of cell entry factors of the transduced compared to parental cells was approximately 20, 2, 7 and 40fold for CD81, SR-BI, CLDN and OCLN, respectively (Fig. 3A). As shown in Fig. 3B, overexpression of CD81 markedly and significantly enhanced viral entry of the VL (3.2fold) and the VC (2fold) strains compared to the parental cells ( $p < 0.001$ ). The fold change in HCVpp entry was significantly higher for the VL strain than for the VC strain ( $p < 0.001$ ). Moreover, by exchanging the two residues at position 458 and 478, viral entry was similarly increased. These data suggest that the combination of the two individual mutations modulate viral entry by altering CD81-dependency. The functional relevance of CD81-dependency was further confirmed by inhibition experiments using an anti-CD81 antibody: whereas entry of the VL strain was inhibited by anti-CD81 (JS-81) antibody with an  $IC_{50}$  of 1.7  $\mu\text{g/ml}$ , entry of the VC strain was inhibited by an  $IC_{50}$  of 3.2  $\mu\text{g/ml}$ . Introduction of the double mutations into the VC strain restored the  $IC_{50}$  to 1.7  $\mu\text{g/ml}$  (data not shown).

Overexpression of SR-BI also increased viral entry of the VL and the VC variants, but no specific increase was observed for HCVpp derived from the chimeric strains containing substitutions at positions 458 and 478 (Fig. 3B). These data confirm an important role for SR-BI as an entry factor for patient-derived variants, but also demonstrate that positions 458 and 478 do not significantly alter SR-BI dependency. Thus, the increased entry efficiency of the VL in SR-BI overexpressing cells is most likely due to other mutations, e. g. in HVR1. The overexpression of tight junction proteins claudin-1 and occludin enhanced viral entry less pronounced than CD81 and SR-BI (Fig. 3B) and a specific modulation of viral entry was not associated with the two variants or chimeric strains. Taken together, these data demonstrate that (i) the escape variant is characterized by markedly altered CD81 usage and that (ii)

the altered CD81 usage of the variant is mediated by residues at positions 458 and 478.

Next, we assessed whether enhanced entry is due to more rapid internalization of viral particles. To address this question we investigated internalization of the parental and chimeric variants in the presence of anti-CD81 antibody using a previously described kinetic assay (Koutsoudakis et al. 2006; Zeisel et al. 2007; Haberstroh et al. 2008; Krieger et al. 2010). Since entry kinetics of parental and chimeric variants were similar (Fig. 3C), it is unlikely that the mutant-induced modulation of CD81-dependency alters the velocity of viral entry.

**High entry mutations modulate E2-CD81 large extracellular loop (LEL) interactions.** Since the nature of residues at positions 458 and 478 had a significant impact on HCV entry by altering CD81 receptor dependency, we further investigated whether the mutations affect viral binding to CD81. To address this question we used a well characterized CD81-LEL ELISA (Keck et al. 2009). In this ELISA, purified HCVpp are used as a capture antigen interacting with the soluble LEL of CD81. As shown in Fig. 4, the variants VC and VLVC<sub>458+478</sub> purified HCVpp bound less efficiently to CD81-LEL than the VL and VCVL<sub>458+478</sub>. These data suggest that the residues at positions 458 and 478 alter binding to CD81-LEL.

**Positions 458 and 478 mediate escape from autologous transplant serum during graft re-infection.** To assess whether the residues in region E2<sub>425-483</sub> influencing viral entry (Fig. 1) were also responsible for escape from antibody-mediated neutralization, we studied the impact of each single and combined substitutions on neutralization by autologous transplant serum. As shown in Fig. 5A, autologous pre-transplant serum only poorly neutralized the selected variant VL as well as the variants substituted at position 434, 444, 445. In contrast, individual substitution at positions 458 and 478 markedly and significantly ( $p < 0.001$ ) increased the sensitivity of VLVC<sub>458</sub> and VLVC<sub>478</sub> to autologous host neutralizing antibodies (1:400 and 1:200). However, only the variant VLVC<sub>458+478</sub> containing the combined mutations showed a similar neutralization titer as the nonselected variant VC (1:6,400). To confirm that the mutations were indeed responsible for the phenotype of the parental variant VL, we investigated neutralization of the variant VCVL<sub>458+478</sub> containing the combined mutations by autologous serum. As shown in Fig. 5B, the

variant VCVL<sub>458+478</sub> escaped autologous neutralization similarly to the escape variant VL. Taken together, these findings suggest that the residues at positions 458 and 478 not only mediate enhanced viral entry but are also responsible for evasion from antibody-mediated neutralization.

### **Escape from neutralization by interference of non-neutralizing antibodies.**

Previous studies have demonstrated that the envelope glycoprotein E2 contains an epitope termed “epitope II” (aa 434-446). This epitope is recognized by host non-neutralizing antibodies which have been proposed to disrupt virus neutralization by antibodies that target epitope I, a highly conserved glycoprotein segment located upstream (aa 412-419) (Zhang et al. 2007; Zhang et al. 2009). To address the relevance of epitope II and interfering antibodies for escape in acute graft infection, we pre-incubated autologous patient serum with a peptide encoding for epitope II and its N-terminal adjacent sequence specific for variant VL. Subsequently, the serum was incubated with HCVpp bearing E1E2 envelope glycoproteins from VL and VC and then added to Huh7.5.1 cells. By capturing interfering antibodies from the autologous serum using a peptide encoding for epitope II of the VL strain, HCVpp bearing VL envelope glycoproteins were more efficiently neutralized compared to mock-treated serum (Figure S1). These data indicate that epitope II captures non-neutralizing antibodies which interfere with neutralization of the VL strain. In contrast, pre-incubation of autologous serum with VL peptide did not modulate neutralization of VC (Figure S1). To address whether positions 458 and 478 mediate viral evasion from neutralizing antibodies through modulation of non-neutralizing antibodies-epitope II interactions, we pre-incubated autologous patient serum with epitope II peptide and studied antibody-mediated neutralization of the chimeric variants VCVL<sub>458+478</sub> and VCVL<sub>458+478</sub>. The presence of mutations at positions S458G and R478C in the VC background conferred a similar phenotype as observed for peptide II and VL (data not shown). These data suggest that (i) interfering antibodies may contribute to escape from neutralizing antibodies in acute graft infection in this patient and (ii) mutations at positions 458 and 478 appear to modulate the effect of epitope II-captured antibodies on neutralization (Figure S1 and data not shown). Since neutralization was only partially reversed by epitope II-mediated capture of noninterfering antibodies, it is likely that this mechanism acts in combination with other factors.

**Positions 458 and 478 define a conformational epitope involved in evasion from host neutralizing responses.** To further elucidate the mechanism of viral evasion of the escape variant VL from patient-derived neutralizing antibodies, we investigated whether the identified mutations S458G and R478C confer resistance or sensitivity to a panel of HMAb directed against conformational (Hadlock et al. 2000; Keck et al. 2009) and linear epitopes (Haberstroh et al. 2008). The conformational HMAbs (CBH-2, CBH-5, CBH-23, HC-1, HC-11) have been shown to exhibit a broad cross-neutralizing activity by interfering with E2-CD81 interaction (Hadlock et al. 2000; Keck et al. 2009). The epitopes targeted by the HMAbs antibodies are only partially defined (Table S1). AP33 is directed against a conserved epitope comprising aa 412-423 (Owsianka et al. 2005). As shown in Figure 6A, the escape variant VL was poorly neutralized by several HMAbs directed against conformational epitopes. In contrast, the nonselected variant VC was efficiently neutralized by all HMAbs. Moreover, by substituting the residues at positions 458 and 478, the well neutralized nonselected variant VC (VCVL<sub>458+478</sub>) became resistant to neutralization, showing the same phenotype as the escape variant VL. Introduction of the residues of VC into the background of VL (VLVC<sub>458+478</sub>) restored the neutralization activities of HMAbs, confirming that these residues are involved in HMAbs epitopes. In contrast, anti-E2 antibodies (AP33, 16A6, IGH461) targeting linear epitopes outside the identified positions 458 and 478 similarly neutralized parental and chimeric variants (Fig. 6A and Table S1).

Antibody-mediated neutralization occurs at binding and post-binding steps during viral entry as previously shown by our laboratory (Haberstroh et al. 2008). To map the entry step involved in viral evasion from neutralizing antibodies by the VL strain, we investigated the neutralization of parental and chimeric variants in kinetic assays (Zeisel et al. 2007; Krieger et al. 2010). As shown in Fig. 6B, the anti-E2 HMAb CBH-23 inhibited viral entry at a post-binding step during time points closely related to HCV-CD81 interaction. The VL variant escaped antibody-mediated neutralization at the same step. Taken together, these data indicate that the positions 458 and 478 mediate viral evasion from neutralizing antibodies at a post-binding step and time point closely related to HCV-CD81 interaction.

**Positions 458 and 478 mediate escape from antiviral antibodies in non-related patients with chronic HCV infection.** To investigate whether these mutations not only result in escape from autologous antibodies from the same patient but also confer resistance to antiviral antibodies of non-related HCV infected patients, we studied the neutralization of the parental variants by a large panel of sera randomly selected from chronically infected patients. As shown in Figure 7 and Table S2, the variant VL was only poorly neutralized by the large majority of the patient sera compared to variant VC. The difference in neutralization between the escape variant VL and the nonselected variant VC was highly significant ( $p = 0.0043$ ). These data suggest that the epitope containing residues at positions 458 and 478 is not only responsible for viral evasion from autologous antiviral antibodies in the patient undergoing LT but appears to contribute to the evasion from antiviral antibodies in chronic HCV infection in general.

## DISCUSSION

Although many studies have characterized viral escape from monoclonal neutralizing antibodies *in vitro* (Gal-Tanamy et al. 2008; Grove et al. 2008; Bankwitz et al. 2010), the mechanism of viral evasion from patient-derived antibodies *in vivo* is only poorly understood. By comparative functional analyses of strains from a patient with acute liver graft infection we identify E2 positions 458 and 478 as a key factor for viral entry in the HCV-infected patient *in vivo*. Furthermore, mutations at the same positions mediate escape from neutralization by autologous antibodies. We further demonstrate that the two positions confer resistance to neutralization from antibodies derived from non-related patients with chronic HCV infection. These data suggest that the residues at these positions are part of a clinically relevant neutralizing epitope mediating viral evasion from neutralizing host responses in general. Taken together, our data identify a novel and clinically relevant escape mechanism, where co-evolution simultaneously occurs between CD81 usage and escape from neutralization.

CD81 has been shown to be a critical host cell factor for viral entry (McKeating et al. 2004; Lindenbach et al. 2005) and is thought to be mediated by at least three binding regions within the HCV E2 glycoprotein. These include domain I (aa 412 - 424), II (aa 474 - 495) and III (aa 520 - 550) (Owsianka et al. 2006). Position 458 is located downstream of the putative CD81 binding domain I (Drummer et al. 2006)



whereas position 478 lies within the putative CD81 binding domain II (Owsianka et al. 2006). Taken together, our findings suggest that the naturally occurring mutations at positions 458 and 478 are crucial for E2-CD81-LEL interactions and identify envelope-CD81 interactions as a key factor for viral evasion during re-infection of the liver graft.

The same mutations were also responsible for the immune evasive phenotype of the escape variant VL. Neutralization studies using monoclonal antibodies directed against discontinuous envelope glycoprotein region termed domain B (Keck et al. 2004; Helle et al. 2007) demonstrate that the two positions are part of an epitope which plays a key role for neutralization and viral evasion. Since the mutations are outside the known contact residues within the epitopes of the HMAbs CBH-2, CBH-5, CBH-23 and HC-1 (Hadlock et al. 2000; Keck et al. 2009) (Table S1) and complementary to previously identified regions associated with escape from neutralizing monoclonal antibodies (Owsianka et al. 2005), positions 458 and 478 either modulate the interaction of the majority of antibodies directed at domain B epitopes or are part of a novel E2 epitope mediating evasion from host neutralizing antibodies. Kinetic studies (Fig. 6B) indicate that evasion from neutralizing antibodies occurs at a post-binding step and time point closely related to HCV-CD81 interaction.

Taking into account that the combined mutations S458G and R478C (i) modulate CD81-dependency of HCV entry (Fig. 3), (ii) increase the affinity to the CD81-LEL (Fig. 4), (iii) mediate viral evasion from antibodies at a post-binding step closely related to HCV-CD81 interactions (Fig. 6) and (iv) are located within E2 loops of the predicted E2 secondary structure and tertiary organization (Krey et al. 2010), it is likely that positions 458 and 478 are part of two envelope glycoprotein loops that belong to a larger cluster of closely related surface exposed loops of E2. These loops are most likely involved in the binding of HCV E2 to CD81-LEL either directly by interactions between residues from these loops and CD81-LEL or indirectly as a key point for structural rearrangement during viral entry. Direct and indirect interactions may occur simultaneously and subsequently at different time points of the multi-step entry process.

The polar S and R residues present in the escape variant can form non-bonded interactions with other residues by hydrogen bonds (weak interaction) and salt bridge (R, strong interaction). Thus, it is conceivable that these non-bonded interactions can increase the stability of the interacting HCV E2-CD81-LEL interface

allowing efficient entry of the VL escape variant. Furthermore, the E2 cluster of loops containing the mutations bears linear epitopes but also defines at least one conformational epitope that is a target of neutralizing antibodies. According to residue physical-chemical properties, the VL variant S458 and R478 residues enhance the hydrophilicity of the loops they belong to and thus could promote the surface exposure of the loops. This change could further modulate E2-CD81-LEL-interactions and impair the binding of neutralizing antibodies by blocking access to their target epitopes.

What is the clinical relevance of our results? First, the identified residues and their functional impact for entry and neutralization define a novel mechanism of viral escape during re-infection of the liver graft. These findings significantly advance our knowledge on clinically relevant mechanisms of viral escape and the understanding of the pathogenesis of early graft HCV re-infection. Furthermore, our results indicate that this escape mechanism may be clinically relevant for chronic HCV infection in general. This concept is supported by the finding that the mutations present in VL strain conferred at least partial resistance to antibodies of patients infected with viruses of different isolates and genotypes (Figure 7 and Table S2). Furthermore, the residues conferred escape from the majority of monoclonal neutralizing antibodies isolated from patients with chronic infection (HMABs CBH-2, CBH-5, CBH-23, HC-1; Fig. 6). The relevance of these positions for pathogenesis of HCV infection in general is further supported by a bioinformatics sequence analysis of a large panel of 2,074 HCV strains (including 455 subtype 1b strains) within the European HCV database (Kuiken et al. 2006; Combet et al. 2007). As shown in Fig. S2, residues S and R are much more frequently observed at positions 458 and 478 than G and C. S is the predominant residue at position 458 in the large majority of 1b strains (all: 94% for 1b: 90.3%; Fig. S2). The position 478 is variable but R (all: 2.4% for 1b: 10.8%) is more frequent than C (all: 0.2%, 1b: 0.9%) (Fig. S2). The high prevalence of the S and R residues underlines their functional relevance for virus survival and selection in general as more structurally and functionally relevant residues will be more frequently observed.

Second, our findings illustrate the challenge for the development of antiviral therapies based on neutralizing antibodies. Although proof-of-concept studies in animal models have demonstrated a potential role for HMABs in prevention of HCV infection (Law et al. 2008; Vanwolleghem et al. 2008), the partial or complete escape

of the VL variant from autologous and heterologous serum-derived antibodies as well as many broadly cross-neutralizing HMABs in this study (Fig. 6; Table S1) demonstrates the marked ability of the virus to evade host immune responses and cross-neutralizing HMABs.

On the other hand, the findings may also open new perspectives for the development of more efficient antiviral strategies by further defining the molecular mechanisms of escape. By identifying viral and host factors mediating immune evasion during re-infection in the patient and identifying monoclonal antibodies efficiently neutralizing escape variants, our results may guide the development of improved anti-envelope antibodies overcoming escape. Since the escape variant VL has been shown to be sensitive to inhibition by anti-CLDN1 (Fofana et al. 2010) and anti-CD81 (Fafi-Kremer et al. 2010) antibodies, targeting host entry factors may be an attractive alternative concept for prevention of HCV re-infection. Indeed, antibodies against CD81 (Meuleman et al. 2008) and CLDN1 (Fofana et al. 2010; Krieger et al. 2010) have been proposed as a promising strategy to prevent HCV graft re-infection. Thus, an approach combining anti-envelope with anti-receptor antibodies may be a promising strategy because it imposes a higher genetic barrier for resistance.

In conclusion, our findings identify a novel and clinically relevant mechanism for viral evasion that is an important factor for efficient re-infection of the liver graft and escape from host responses. The identification of this mechanism not only advances our understanding of the pathogenesis of HCV infection but paves the way for the development of novel preventive antiviral strategies targeting envelope glycoprotein-host entry factor interactions.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Patients.** Patient 01 is a 60-year-old man who was diagnosed with HCV genotype 1-associated cirrhosis and HCC (MELD score 9.32) in January 2000. The route of HCV transmission was unknown. In May 2001, an antiviral treatment consisting of PegIFN- $\alpha$  and ribavirin had to be stopped because of adverse effects. In May 2004, he underwent LT with subsequent graft re-infection. He received immunosuppressive therapy that included tacrolimus and corticoids. Sequential sera of this patient were obtained with the approval of the Strasbourg University Hospital IRB (ClinicalTrial.gov Identifier NCT00213707). Evolution and functional analysis of viral variants of this

patient have been described previously (Fafi-Kremer et al. 2010). Anti-HCV-positive serum samples from patients with chronic HCV infection followed at the Gastroenterology-Hepatology Service, University Hospital, Strasbourg, were obtained within ClinicalTrial.gov Identifier NCT00638144 with approval from the Strasbourg University Hospital IRB. Viral load was quantified using Bayer Versant HCV RNA 3.0 (Bayer Diagnostics, France). HCV genotypes were determined by the Trugene 5' NC genotyping kit (Bayer Diagnostics, France).

**Reagents.** Monoclonal anti-E1 (11B7) and anti-E2 (AP33, IGH461, 16A6), human anti-HCV IgG antibodies (Pestka et al. 2007; Haberstroh et al. 2008), HMAbs CBH-2, CBH-5, CBH-23, HC-1 and HC-11 have been described (Hadlock et al. 2000; Keck et al. 2009). Anti-CD81 (JS-81) was obtained from BD Biosciences.

**Plasmids.** Expression plasmids for HCVpp production of variants VL and VC have been described (Fafi-Kremer et al. 2010). The plasmids containing the VL and the VC E1E2-encoding sequences were used as templates for individual and combinations of mutations using the QuikChange II XL site-directed mutagenesis kit (Stratagene). All mutations were confirmed by DNA sequence analysis (Cogenics) for the desired mutation and for exclusion of unexpected residue changes in the full-length E1E2 encoding sequences. The mutated constructs were designated X#Y, where # is the residue location in H77c (Kuiken et al. 2006), X is the mutated amino acid, and Y is the original amino acid.

**Cell lines.** HEK 293T and Huh7.5.1 cells were cultured as described (Zhong et al. 2005; Pestka et al. 2007; Haberstroh et al. 2008). Huh7.5.1 cells overexpressing HCV entry factors were created by stable lentiviral gene transfer using the self-inactivating vector pWPI-BSD (Addgene, USA) transducing CLDN1, OCLN, SR-BI or CD81 as described (Haid et al. 2009). Cell surface receptor expression was assessed using receptor-specific antibodies and flow cytometry as described (Barth et al. 2008; Ploss et al. 2009; Krieger et al. 2010 ).

**Analysis of HCVpp envelope glycoprotein expression.** Expression of HCV glycoproteins was characterized in HEK 293T producer cells and HCVpp purified through a 20% sucrose cushion ultracentrifugation as described (Fafi-Kremer et al.

2010). Immunoblots of HCV glycoproteins were performed using anti-E1 11B7 and anti-E2 AP33 as described (Pestka et al. 2007).

**E2 binding to Huh7.5.1 cells.** HEK 293T cells transfected with plasmids expressing patient-derived envelope glycoproteins were lysed in PBS by four freezing and thawing cycles. Cell debris and nuclei were removed by low-speed centrifugation and supernatants containing native intracellular E1E2 complexes were used for binding studies. Huh7.5.1 cells ( $2 \times 10^5$  cells per well) were seeded in 96 well plates. Following incubation with HEK 293T cell lysates containing patient-derived E1E2 proteins for 60 min at room temperature (RT), Huh7.5.1 target cells were first incubated with mAb AP33 (10  $\mu$ g/ml) for 60 min at RT and then with phycoerythrin-conjugated anti-mouse Ab (5  $\mu$ g/ml, BD) for 45 min at 4°C. Following washing of cells with PBS, bound E2 was analyzed by flow cytometry as described (Krieger et al. 2010).

**HCVpp production, infection and neutralization.** Lentiviral HCVpp bearing patient-derived HCV envelope glycoproteins from viral isolates were produced as described (Bartosch et al. 2003; Pestka et al. 2007). HCVpp entry and neutralization were performed as described (von Hahn et al. 2007; Haberstroh et al. 2008; Krieger et al. 2010 ). Prior to infection studies, the amount of HCVpp was normalized following quantification of HIV p24 antigen expression (Innotest HIV Antigen mAb Kit, Innogenetics).

**Analysis of E2-CD81 large extracellular loop (LEL) interactions by quantitative enzyme-linked immunoassays (ELISA).** E2-CD81-LEL interactions were analyzed using purified patient-derived HCVpp and an LEL-ELISA as described (Keck et al. 2009).

**Kinetic assays.** HCVpp kinetic assays were performed in Huh7.5.1 cells using anti-CD81 (JS-81) and anti-E2 (CBH-23) mAbs as described (Zeisel et al. 2007; Krieger et al. 2010).

**Analysis of interfering antibodies using a peptide-capture assay.** The impact of interfering antibodies for neutralization was analyzed as described (Zhang et al.

2007; Zhang et al. 2009). Peptides encoding for epitope II and its N-terminal adjacent sequence (aa 427-446) corresponding to the amino acid sequence of VL (LNCNDSLQTGFLAALFYTHK) or VC (LNCNDSLHTGFLAALFYANK) were synthesized by Genaxxon Biosciences. 40 µg/ml of epitope II peptide were added to autologous or control serum at a dilution of 1/400 and incubated for 60 min at 37°C. Peptide-treated or untreated control samples were subsequently added to HCVpp. Infection of HCVpp bearing envelope glycoproteins from parental or chimeric variants was analyzed as described above.

**Bioninformatics.** From the multiple sequence alignment of complete E2 proteins downloaded from the European HCV databases (Combet et al. 2007), (<http://euhcvdb.ibcp.fr>) two amino-acids repertoire were computed with all E2 sequences and all E2 sequences of provisional/confirmed genotype 1b using the *ComputeRepertoire* tool as part of the euHCVdb *Extract* tool.

**Statistical analysis.** Statistical analysis (Repeated Measures ANOVA) was performed using the SPSS 16.0 software for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL).

**Acknowledgements:** The authors thank F. Chisari (The Scripps Research Institute, La Jolla) for the gift of Huh7.5.1 cells, A. Patel (MRC Centre of Virology, Glasgow, UK) for the gift of antibody AP33 and R. Bartenschlager (University of Heidelberg, Heidelberg, Germany), J. A. McKeating (University of Birmingham, Birmingham, UK), C. Rice (Rockefeller University, New York City), C. Schuster (Inserm U748, Strasbourg, France), H. E. Blum (University of Freiburg, Freiburg, Germany) and F. Rey (Institut Pasteur, Paris) for helpful discussions.

## REFERENCES

- Alter, H. (2006). Viral hepatitis. *Hepatology* 43: S230-234.
- Bankwitz, D., Steinmann, E., Bitzegeio, J., Ciesek, S., Friesland, M., Herrmann, E., Zeisel, M. B., Baumert, T. F., Keck, Z. Y., Fong, S. K., et al. (2010). Hepatitis C virus hypervariable region 1 modulates receptor interactions, conceals the CD81 binding site, and protects conserved neutralizing epitopes. *J Virol* 84: 5751-5763.
- Barth, H., Schnober, E. K., Neumann-Haefelin, C., Thumann, C., Zeisel, M. B., Diepolder, H. M., Hu, Z., Liang, T. J., Blum, H. E., Thimme, R., et al. (2008).

Scavenger receptor class B is required for hepatitis C virus uptake and cross-presentation by human dendritic cells. *J Virol* 82: 3466-3479.

Bartosch, B., Dubuisson, J. and Cosset, F. L. (2003). Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J. Exp. Med.* 197: 633-642.

Berenguer, M. (2008). Systematic review of the treatment of established recurrent hepatitis C with pegylated interferon in combination with ribavirin. *J Hepatol* 49: 274-287.

Brown, R. S. (2005). Hepatitis C and liver transplantation. *Nature* 436: 973-978.

Combet, C., Garnier, N., Charavay, C., Grando, D., Crisan, D., Lopez, J., Dehne-Garcia, A., Geourjon, C., Bettler, E., Hulo, C., et al. (2007). euHCVdb: the European hepatitis C virus database. *Nucleic Acids Res* 35: D363-366.

Drummer, H. E., Boo, I., Maerz, A. L. and Pountourios, P. (2006). A Conserved Gly436-Trp-Leu-Ala-Gly-Leu-Phe-Tyr Motif in Hepatitis C Virus Glycoprotein E2 Is a Determinant of CD81 Binding and Viral Entry. *J Virol* 80: 7844-7853.

Evans, M. J., von Hahn, T., Tschernie, D. M., Syder, A. J., Panis, M., Wolk, B., Hatzioannou, T., McKeating, J. A., Bieniasz, P. D. and Rice, C. M. (2007). Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* 446: 801-805.

Fafi-Kremer, S., Fofana, I., Soulier, E., Carolla, P., Meuleman, P., Leroux-Roels, G., Patel, A. H., Cosset, F.-L., Pessaux, P., Doffoël, M., et al. (2010). Enhanced Viral Entry and Escape from Antibody-Mediated Neutralization Are Key Determinants for Hepatitis C Virus Re-infection in Liver Transplantation. *J Exp Med* 207: 2019-2031.

Fofana, I., Krieger, S. E., Grunert, F., Glaubien, S., Xiao, F., Fafi-Kremer, S., Soulier, E., Mee, C. J., McKeating, J. A., Dragic, T., et al. (2010). Monoclonal anti-claudin 1 antibodies for prevention of hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 139: 953-964, 964.e951-954.

Gal-Tanamy, M., Keck, Z. Y., Yi, M., McKeating, J. A., Patel, A. H., Fong, S. K. and Lemon, S. M. (2008). In vitro selection of a neutralization-resistant hepatitis C virus escape mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 19450-19455.

Grove, J., Nielsen, S., Zhong, J., Bassendine, M. F., Drummer, H. E., Balfe, P. and McKeating, J. A. (2008). Identification of a residue in hepatitis C virus E2 glycoprotein that determines scavenger receptor BI and CD81 receptor dependency and sensitivity to neutralizing antibodies. *J Virol* 82: 12020-12029.

Haberstroh, A., Schnober, E. K., Zeisel, M. B., Carolla, P., Barth, H., Blum, H. E., Cosset, F. L., Koutsoudakis, G., Bartenschlager, R., Union, A., et al. (2008). Neutralizing host responses in hepatitis C virus infection target viral entry at postbinding steps and membrane fusion. *Gastroenterology* 135: 1719-1728.

Hadlock, K. G., Lanford, R. E., Perkins, S., Rowe, J., Yang, Q., Levy, S., Pileri, P., Abrignani, S. and Fong, S. K. (2000). Human monoclonal antibodies that inhibit binding of hepatitis C virus E2 protein to CD81 and recognize conserved conformational epitopes. *J Virol* 74: 10407-10416.

Haid, S., Windisch, M. P., Bartenschlager, R. and Pietschmann, T. (2009). Mouse-specific residues of claudin-1 limit hepatitis C virus genotype 2a infection in a human hepatocyte cell line. *J Virol* 84: 964-975.

Helle, F., Goffard, A., Morel, V., Duverlie, G., McKeating, J., Keck, Z. Y., Fong, S., Penin, F., Dubuisson, J. and 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.

Keck, Z. Y., Li, S. H., Xia, J., von Hahn, T., Balfe, P., McKeating, J. A., Witteveldt, J., Patel, A. H., Alter, H., Rice, C. M., et al. (2009). Mutations in hepatitis C virus E2 located outside the CD81 binding sites lead to escape from broadly neutralizing antibodies but compromise virus infectivity. *J Virol* 83: 6149-6160.

Keck, Z. Y., Op De Beeck, A., Hadlock, K. G., Xia, J., Li, T. K., Dubuisson, J. and Fong, S. K. (2004). Hepatitis C virus E2 has three immunogenic domains containing conformational epitopes with distinct properties and biological functions. *J Virol* 78: 9224-9232.

Koutsoudakis, G., Herrmann, E., Kallis, S., Bartenschlager, R. and Pietschmann, T. (2006). The level of CD81 cell surface expression is a key determinant for productive entry of Hepatitis C Virus into host cells. *J Virol* 81: 588-598.

Krey, T., d'Alayer, J., Kikuti, C. M., Saulnier, A., Damier-Piolle, L., Petitpas, I., Johansson, D. X., Tawar, R. G., Baron, B., Robert, B., et al. (2010). The disulfide bonds in glycoprotein E2 of hepatitis C virus reveal the tertiary organization of the molecule. *PLoS Pathog* 6: e1000762.

Krieger, S. E., Zeisel, M. B., Davis, C., Thumann, C., Harris, H. J., Schnober, E. K., Mee, C., Soulier, E., Royer, C., Lambotin, M., et al. (2010). Inhibition of hepatitis C virus infection by anti-claudin-1 antibodies is mediated by neutralization of E2-CD81-claudin-1 associations. *Hepatology* 51: 1144-1157.



Kuiken, C., Combet, C., Bukh, J., Shin, I. T., Deleage, G., Mizokami, M., Richardson, R., Sablon, E., Yusim, K., Pawlotsky, J. M., et al. (2006). A comprehensive system for consistent numbering of HCV sequences, proteins and epitopes. *Hepatology* 44: 1355-1361.

Law, M., Maruyama, T., Lewis, J., Giang, E., Tarr, A. W., Stamataki, Z., Gastaminza, P., Chisari, F. V., Jones, I. M., Fox, R. I., et al. (2008). Broadly neutralizing antibodies protect against hepatitis C virus quasispecies challenge. *Nat Med* 14: 25-27.

Lindenbach, B. D., Evans, M. J., Syder, A. J., Wolk, B., Tellinghuisen, T. L., Liu, C. C., Maruyama, T., Hynes, R. O., Burton, D. R., McKeating, J. A., et al. (2005). Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 309: 623-626.

McKeating, J. A., Zhang, L. Q., Logvinoff, C., Flint, M., Zhang, J., Yu, J., Butera, D., Ho, D. D., Dustin, L. B., Rice, C. M., et al. (2004). Diverse hepatitis C virus glycoproteins mediate viral infection in a CD81-dependent manner. *J Virol* 78: 8496-8505.

Meuleman, P., Hesselgesser, J., Paulson, M., Vanwolleghem, T., Desombere, I., Reiser, H. and Leroux-Roels, G. (2008). Anti-CD81 antibodies can prevent a hepatitis C virus infection in vivo. *Hepatology* 48: 1761-1768.

Owsianka, A., Tarr, A. W., Juttla, V. S., Lavillette, D., Bartosch, B., Cosset, F. L., Ball, J. K. and Patel, A. H. (2005). Monoclonal antibody AP33 defines a broadly neutralizing epitope on the hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein. *J Virol* 79: 11095-11104.

Owsianka, A. M., Timms, J. M., Tarr, A. W., Brown, R. J., Hickling, T. P., Szwejk, A., Bienkowska-Szewczyk, K., Thomson, B. J., Patel, A. H. and Ball, J. K. (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.

Pestka, J. M., Zeisel, M. B., Blaser, E., Schurmann, P., Bartosch, B., Cosset, F. L., Patel, A. H., Meisel, H., Baumert, J., Viazov, S., et al. (2007). Rapid induction of virus-neutralizing antibodies and viral clearance in a single-source outbreak of hepatitis C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 6025-6030.

Pileri, P., Uematsu, Y., Campagnoli, S., Galli, G., Falugi, F., Petracca, R., Weiner, A. J., Houghton, M., Rosa, D., Grandi, G., et al. (1998). Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 282: 938-941.

Ploss, A., Evans, M. J., Gaysinskaya, V. A., Panis, M., You, H., de Jong, Y. P. and Rice, C. M. (2009). Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature* 457: 882-886.

Scarselli, E., Ansuini, H., Cerino, R., Roccasecca, R. M., Acali, S., Filocamo, G., Traboni, C., Nicosia, A., Cortese, R. and 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.

Vanwolleghem, T., Bukh, J., Meuleman, P., Desombere, I., Meunier, J. C., Alter, H., Purcell, R. H. and Leroux-Roels, G. (2008). Polyclonal immunoglobulins from a chronic hepatitis C virus patient protect human liver-chimeric mice from infection with a homologous hepatitis C virus strain. *Hepatology* 47: 1846-1855.

von Hahn, T., Yoon, J. C., Alter, H., Rice, C. M., Rehermann, B., Balfe, P. and McKeating, J. A. (2007). Hepatitis C virus continuously escapes from neutralizing antibody and T-cell responses during chronic infection in vivo. *Gastroenterology* 132: 667-678.

Zeisel, M. B., Koutsoudakis, G., Schnober, E. K., Haberstroh, A., Blum, H. E., Cosset, F.-L., Wakita, T., Jaeck, D., Doffoel, M., Royer, C., et al. (2007). Scavenger receptor BI is a key host factor for Hepatitis C virus infection required for an entry step closely linked to CD81. *Hepatology* 46: 1722-1731.

Zhang, P., Wu, C. G., Mihalik, K., Virata-Theimer, M. L., Yu, M. Y., Alter, H. J. and Feinstone, S. M. (2007). Hepatitis C virus epitope-specific neutralizing antibodies in Igs prepared from human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 8449-8454.

Zhang, P., Zhong, L., Struble, E. B., Watanabe, H., Kachko, A., Mihalik, K., Virata-Theimer, M. L., Alter, H. J., Feinstone, S. and Major, M. (2009). Depletion of interfering antibodies in chronic hepatitis C patients and vaccinated chimpanzees reveals broad cross-genotype neutralizing activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 7537-7541.

Zhong, J., Gastaminza, P., Cheng, G., Kapadia, S., Kato, T., Burton, D. R., Wieland, S. F., Uprichard, S. L., Wakita, T. and Chisari, F. V. (2005). Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 9294-9299.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1. Positions 458 and 478 confer enhanced viral entry of a high-infectivity variant re-infecting the liver graft.** (A) Epitope mapping strategy is shown as a linear schematic of HCV E1E2. HVR1 and HVR2 are depicted in orange, CD81 binding domains are indicated in green and antibody interfering epitopes I and II (see supplementary results) are indicated in black. Differences between both variants in region 425-483 are displayed beneath. (B) Comparative analysis of viral entry in Huh7.5.1 cells of the selected (escape) variant VL, the nonselected variant VC, the substituted HCVpp derived from P01 VL with single or double substitution from VC and the VC with double substitutions of VL. HCVpp were added to Huh7.5.1 cells and infection was analyzed by luciferase reporter gene expression. Lentiviral p24 antigen expression was measured to assure equal amount of input HCVpp (see Fig. 2). Results are expressed as the percentage of viral entry compared to the escape variant VL. The escape variant VL is depicted in black, substituted variants of VL are depicted in dashed black and grey. The nonselected variant VC is depicted in grey and the substituted variant of VC in dotted grey. Means  $\pm$  SD from at least four independent experiments performed in triplicate are shown. Statistically significant differences in HCVpp entry VC and VL wildtype and mutant variants are indicated by stars (\*,  $p \leq 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.001$ ). Abbreviations: aa - amino acid; BD - binding domain; Ctrl - negative control; HVR - hypervariable region; n.s. - not significant V - viral variant.

**Figure 2. Differences in viral entry are neither due to impaired HCVpp production nor differences in cellular envelope glycoprotein binding.** (A) Analysis of envelope glycoprotein expression. Protein expression was analyzed by immunoblotting as described in Materials and Methods. Molecular markers (kDa) are indicated on the right. (B) Transfection efficiency during HCVpp production. Transfection efficiency was analysed for each variant and control by determining luciferase expression in HEK 293T producer cells expressed as normalized percentage compared to the control. (C) Envelope glycoprotein expression in HCVpp. HCVpp were purified as described previously (Pestka et al. 2007; Fafi-Kremer et al. 2010) and subjected to immunoblot as described in panel (A). (D) Analysis of lentiviral p24 antigen expression p24 was analyzed by ELISA and is indicated as optical density (O.D.) values at 450 nm. (E, F) Cellular binding of E2 derived from

patient-derived or H77 and HCV-J strains. Binding of native E1E2 complexes to Huh7.5.1 cells was detected as described in Materials and Methods. Results are expressed as delta mean fluorescence intensity ( $\Delta$ MFI)  $\pm$  SD (n=3).

**Figure 3. Altered usage of CD81 is responsible for enhanced viral entry of the escape variant.** (A) Expression of entry factors in transduced Huh7.5.1 cells. Huh7.5.1 cells were transduced with lentiviruses expressing SR-BI, CD81, CLDN1 and OCLN. The relative overexpression of entry factors was determined by flow cytometry using receptor-specific antibodies as described in Materials and Methods and is indicated as fold expression compared to parental Huh7.5.1 cells. (B) Receptor-dependency of entry of patient-derived HCVpp. Parental and transduced Huh7.5.1 cells were incubated with parental or chimeric HCVpp and viral entry was determined as described in Fig. 1. Viral entry is expressed as fold change of viral entry compared to the parental cells. Parental variants are depicted in black (VL) or grey (VC). Chimeric variants are depicted in dashed black (VCVL<sub>458+478</sub>) or dotted grey (VLCV<sub>458+478</sub>). Statistically significant differences in HCVpp entry between wildtype and chimeric variants are indicated by stars (\*\*, p < 0.001). (C) Entry kinetic of patient variants. Kinetics of HCVpp entry was performed using anti-CD81 or isotype control antibody (both at 10  $\mu$ g/ml) as described in Material and Methods. HCV entry was determined 48 hours later using luciferase reporter gene expression and is expressed relative to control experiments. VL and VCVL<sub>458+478</sub> are depicted in black, VC and VLCV<sub>458+478</sub> are depicted in grey. A representative experiment out of four is shown. Abbreviations: CLDN1 - Claudin 1; mAb - monoclonal antibody; min - minutes; OCLN - occludin; SR-BI - scavenger receptor-I; V - viral variant.

**Figure 4. Positions 458 and 478 modulate binding of envelope glycoproteins to CD81-LEL.** Respective binding of purified HCVpp to CD81-LEL by ELISA was performed as described (Keck et al. 2009). GNA-captured patient-derived HCVpp were first incubated with purified CD81-LEL. The respective CD81-LEL concentrations are indicated on the x-axis. HCVpp-bound CD81-LEL was then detected using alkaline phosphatase-conjugated mouse anti-human CD81 antibody as described (Keck et al. 2009). The y-axis shows optical density (O. D.) which corresponds to HCVpp bound CD81-LEL. Mean values of three independent

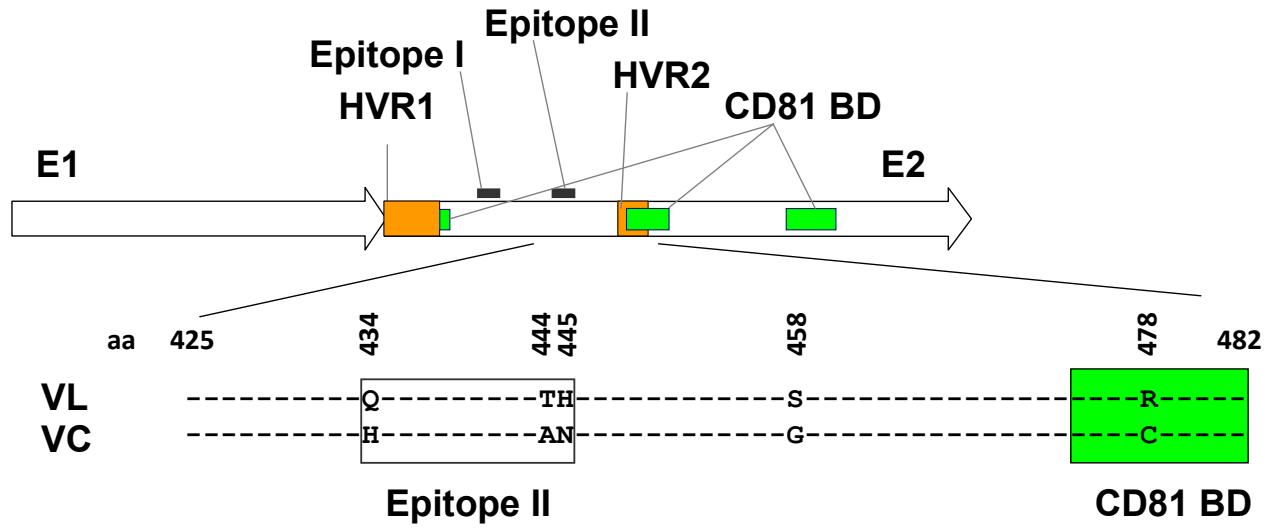
experiments are shown. The insets show Scatchard plots of the equilibrium binding data calculated as described (Keck et al. 2009).

**Figure 5. Positions 458 and 478 mediate viral escape from neutralization by autologous transplant serum.** Comparative analysis of neutralization of the escape variant VL, the nonselected variant VC, the VL variant containing individual or combined mutations of the VC strain and the VC variant with double substitutions of VL. Variant-derived HCVpp were produced as described in Materials and Methods and incubated with autologous anti-HCV positive or control serum in serial dilutions for 1 h at 37°C. HCVpp-antibody complexes were then added to Huh7.5.1 cells. Neutralization titers obtained by endpoint dilution are indicated for each variant. Dotted lines indicate the threshold for a positive neutralization titer corresponding to 1/40. Means  $\pm$  SD from at least four experiments (performed in triplicate) are shown. (A) Neutralization of selected variant VL and chimeric variants by autologous anti-HCV positive pre-transplant serum. (B) Neutralization of nonselected variant VC and variant VCVL<sub>458+478</sub> containing the combined VL mutations S458G and R478C. Statistically significant differences in HCVpp neutralization between VC and VL wildtype and mutant variants are indicated by stars (\*,  $p \leq 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.001$ ). Abbreviations: V - viral variant; Ctrl - negative control.

**Figure 6. Mechanisms of viral evasion from neutralizing antibodies.** (A) Escape from neutralization by HMABs directed against conformational and linear epitopes. HCVpp produced from isolates shown in Fig. 1 were incubated with HMABs (described in Table S1) or isotype control Ab (10  $\mu$ g/ml) for 1 h at 37°C. HCVpp-antibody complexes were then added to Huh7.5.1 cells. Results are expressed as percentage of viral entry relative to HCVpp infection incubated with isotype control mAb. Means  $\pm$  SD from at least four experiments (performed in triplicate) are shown. Statistically significant differences in HCVpp entry between VC and VL wild-type and mutant variants are indicated by stars (\*\*,  $p < 0.001$ ). (B) Escape from neutralization of domain B anti-E2 antibody CBH-23 in kinetic assays. Kinetic assays were performed as described in Fig. 3 (HMAb concentration 10  $\mu$ g/ml; JS-81: 5  $\mu$ g/ml). A representative experiment out of four is shown. VL and VCVL<sub>458+478</sub> are depicted in black, VC and VLVC<sub>458+478</sub> are depicted in grey. Abbreviations: V - viral variant; Ctrl - negative control.

**Figure 7. HCV VL strain is poorly neutralized by heterologous antibodies from nonrelated patients with chronic HCV infection.** HCVpp (VL and VC strains) were preincubated for 1h with serial serum dilutions of anti-HCV positive sera from randomly selected patients with chronic hepatitis C (ClinicalTrial.gov Identifier NCT00638144) prior to incubation of Huh7.5.1 target cells. Patient number, gender, HCV genotype and viral load are indicated in Table S2. Calculation of neutralization and determination of background and thresholds for neutralization were performed as described previously (Fafi-Kremer et al. 2010). Neutralization titers obtained by endpoint dilution are indicated for each individual variant by a dot. The mean titer is marked by a line. Means from at least three independent experiments (performed in triplicate) are shown. Statistically significant differences in neutralization of VC and VL strains are indicated. Abbreviation: V - viral variant.

A.



B.

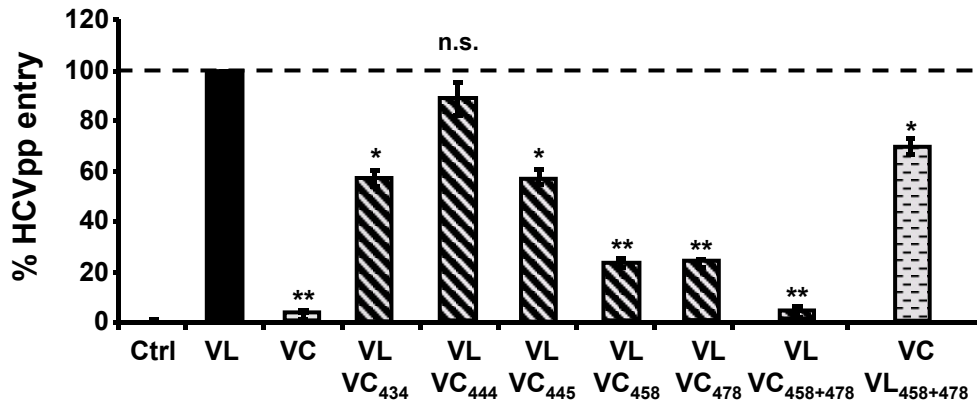


Figure 1

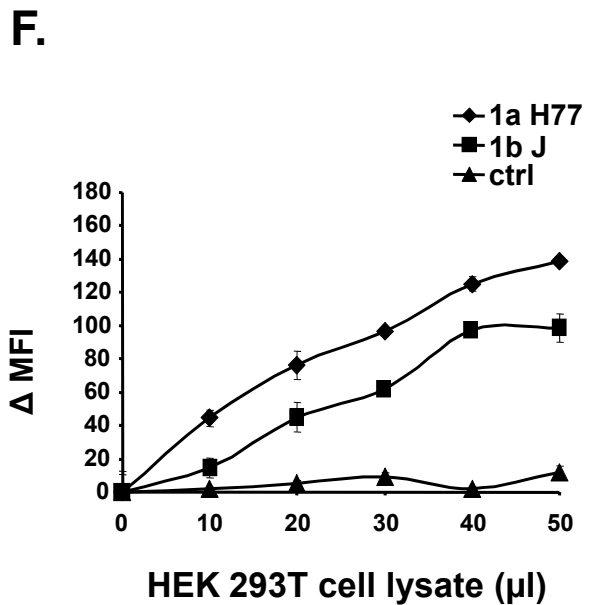
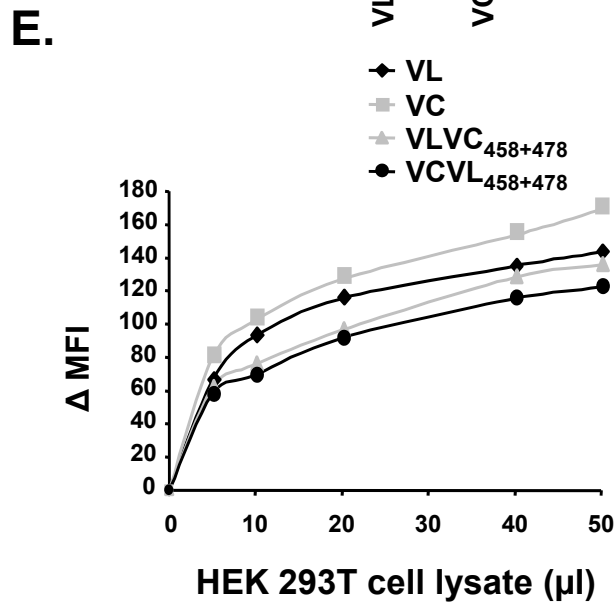
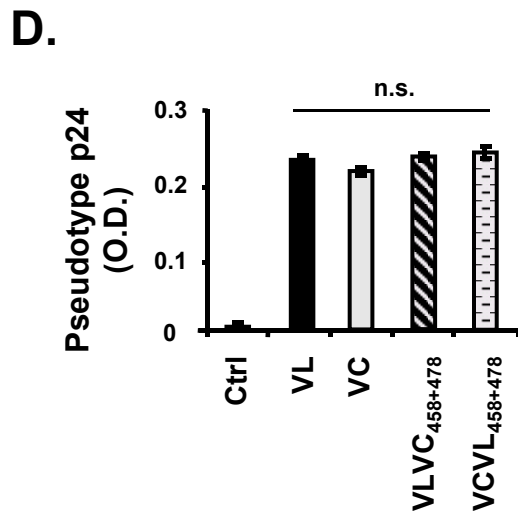
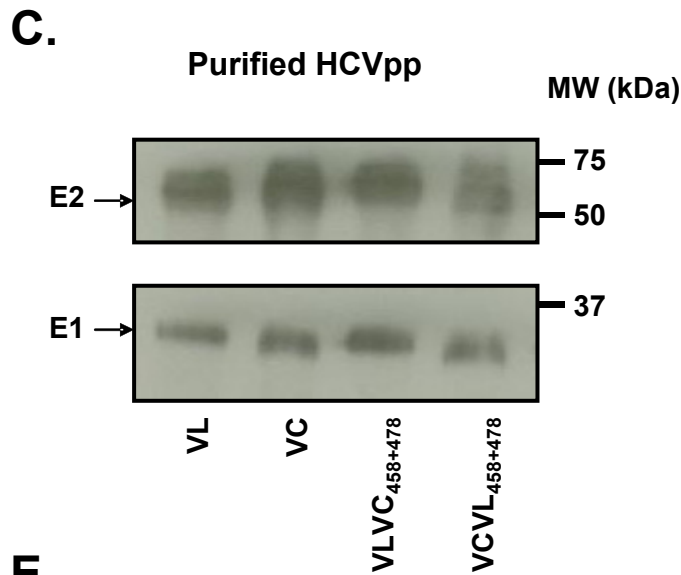
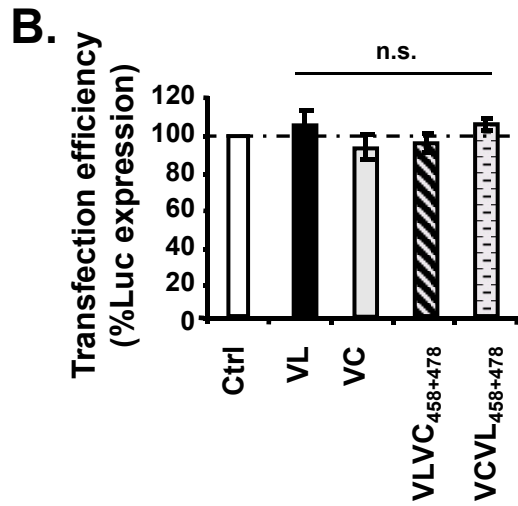
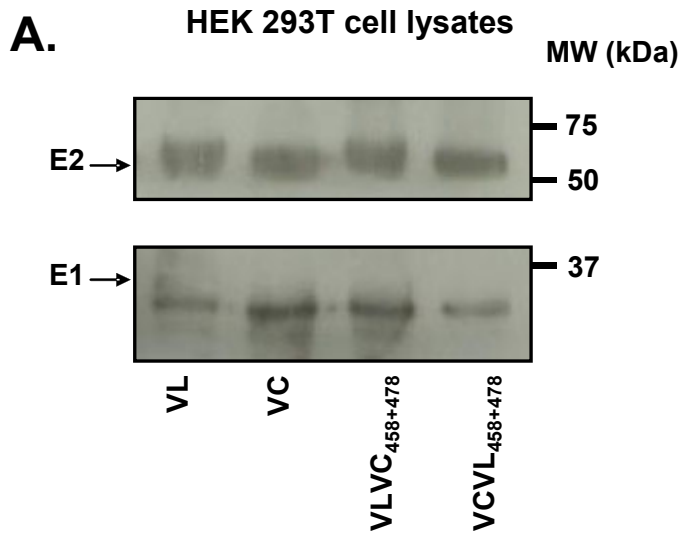


Figure 2



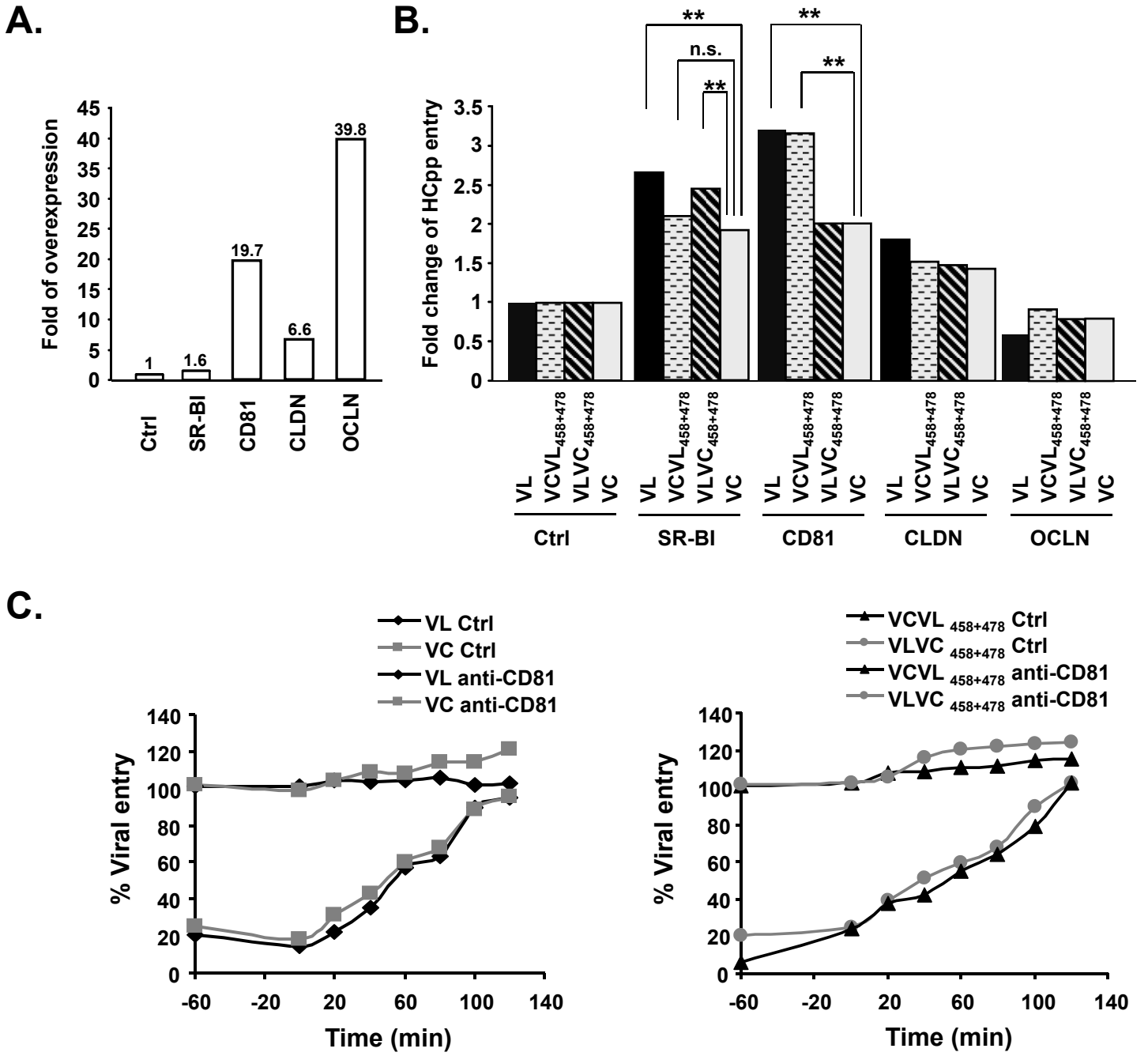


Figure 3

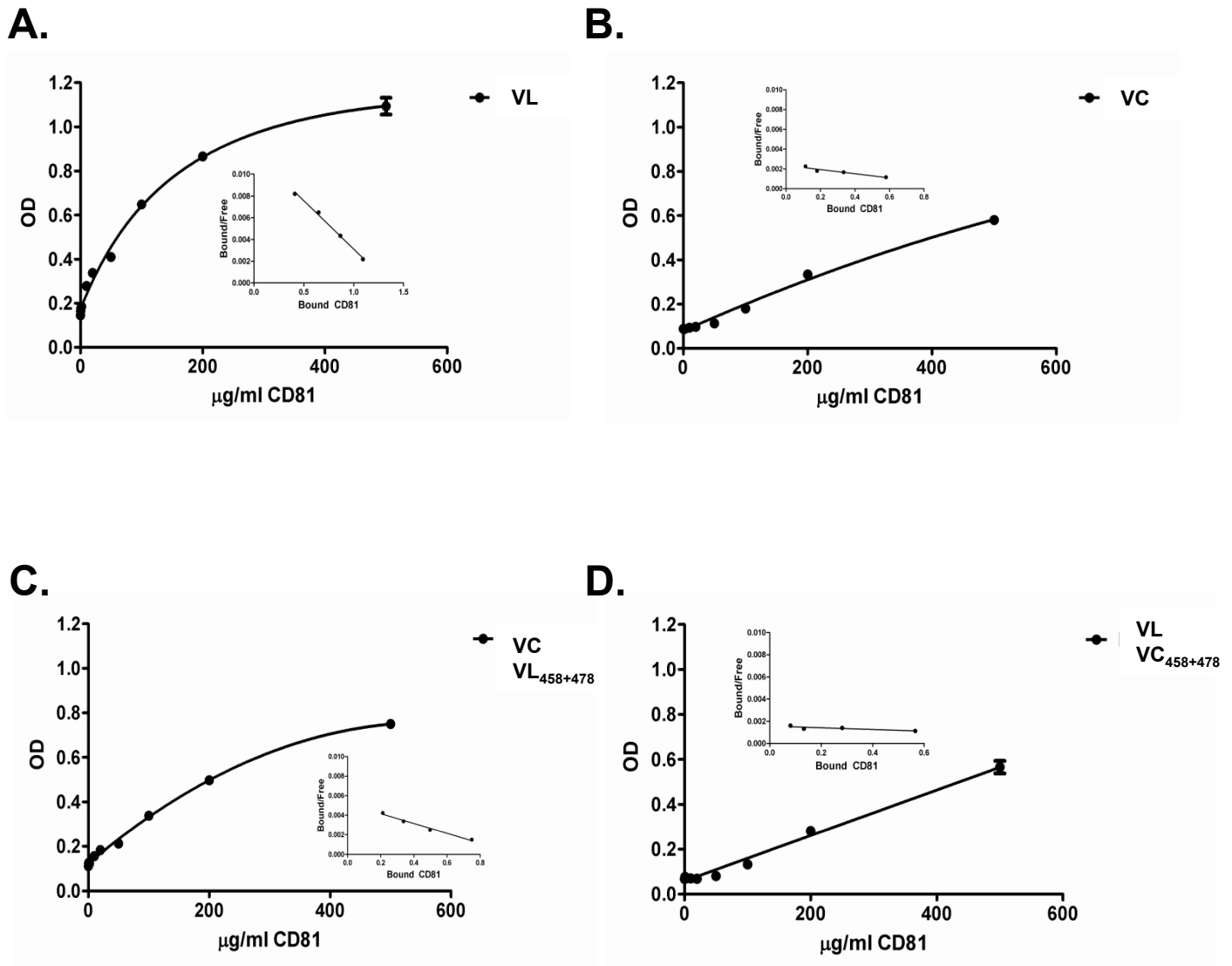
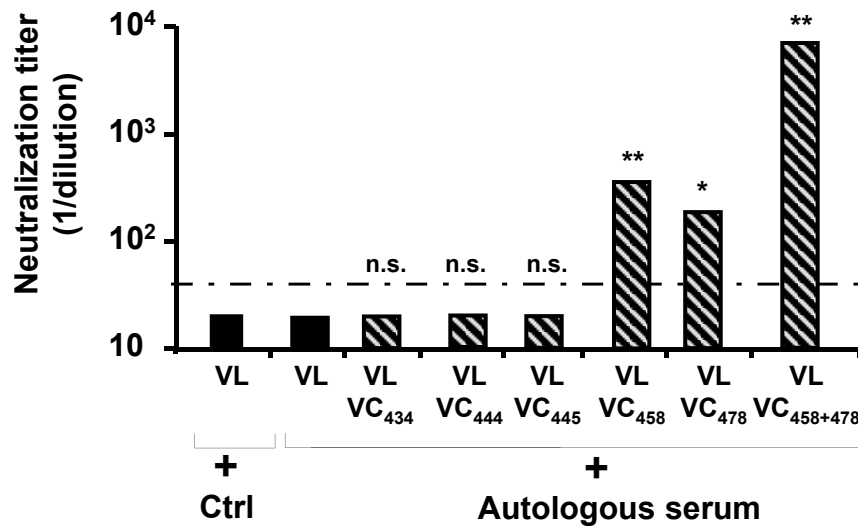


Figure 4

**A.**



**B.**

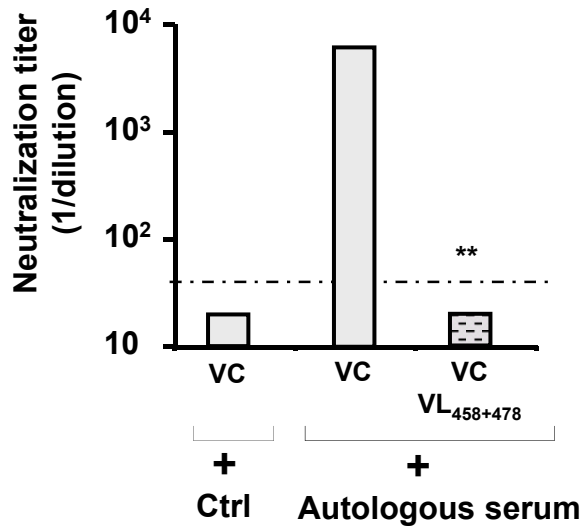
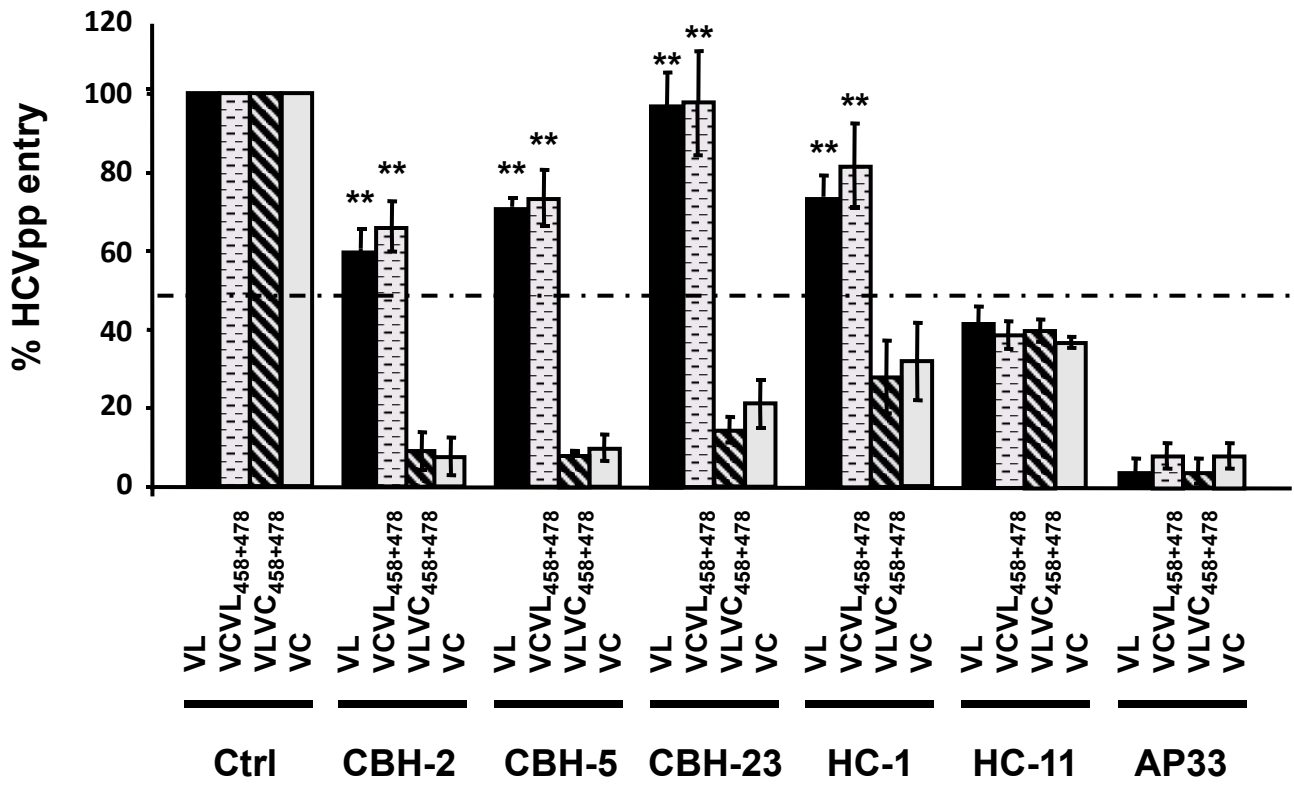


Figure 5

**A.**



**B.**

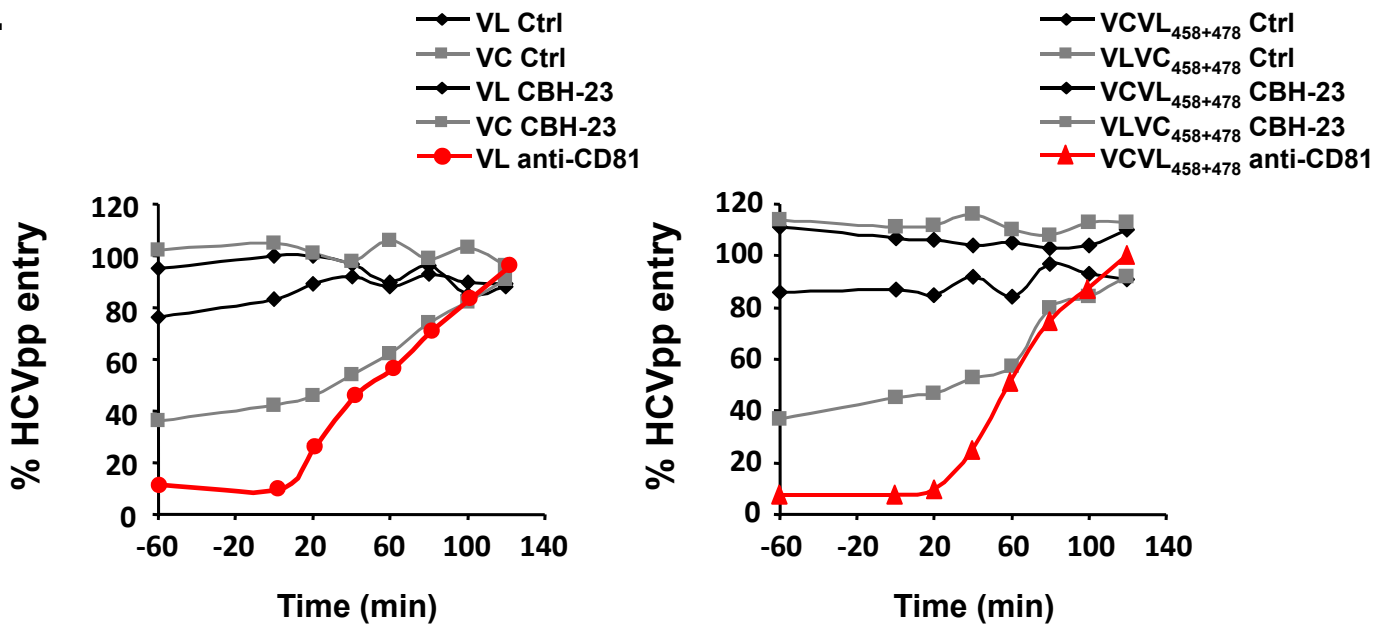


Figure 6



## Supplemental Tables and Figures

**Table S1. Neutralization of patient-derived and chimeric HCVpp by monoclonal anti-envelope antibodies.** HCVpp produced from isolates shown in Figure 1 were incubated with mAbs (10 µg/ml) for 1 h at 37°C. HCVpp-antibody complexes were then added to Huh7.5.1 cells. Viral epitopes targeted by the respective antibody, percent of HCV entry in the presence of antibody (strains VL, VC, VCVL<sub>458+478</sub> and VLVC<sub>458+478</sub>) and source or reference of antibody are shown. Means ± SD from at least three experiments (performed in triplicate) are shown. Abbreviations: V - viral variant; aa - amino acid

Antibody	Source or reference	Epitope (aa)	HCVpp entry (%)			
			VL	VC	VCVL <sub>458+478</sub>	VLVC <sub>458+478</sub>
AP33	(Owsianka et al. 2005)	412-423	6 ± 3	12 ± 1	3 ± 1	11 ± 5
IGH461	(Haberstroh et al. 2008)	436-448	58 ± 4	56 ± 8	51 ± 7	53 ± 3
16A6	(Haberstroh et al. 2008)	523-530	76 ± 10	74 ± 8	83 ± 9	82 ± 2
CBH-2	(Hadlock et al. 2000)	Domain B, conformational 431, 523-540	60 ± 5	8 ± 5	65 ± 6	9 ± 5
CBH-5	(Hadlock et al. 2000)	Domain B, conformational 523-540	71 ± 2	10 ± 4	73 ± 7	8 ± 1
CBH-23	Keck and Foug, unpublished	Domain C, conformational	97 ± 9	21 ± 6	98 ± 13	14 ± 3
HC-1	(Keck et al. 2009)	Domain B, conformational 523-540	73 ± 5	31 ± 9	81 ± 10	27 ± 9
HC-11	(Keck et al. 2009)	Domain B, conformational 523-540	41 ± 4	37 ± 8	39 ± 4	40 ± 3

**Table S2. HCV VL strain is poorly neutralized by heterologous antibodies in patients with chronic HCV infection.** HCVpp were incubated with anti-HCV positive sera from patients with chronic HCV infection as described in Figure 1 (ClinicalTrial.gov Identifier NCT00638144). Patient number, gender, HCV genotype and viral load are indicated. HCVpp-antibody complexes were then added to Huh7.5.1 cells and infection was analyzed as described in Fig. 5. Calculation of neutralization and determination of background and thresholds for neutralization were performed as described previously (Fafi-Kremer et al. 2010). Neutralization titers obtained by endpoint dilution are indicated for each variant. Means from at least three independent experiments (performed in triplicate) are shown. Abbreviations: V - viral variant ; M - male ; F - female.

Patient number	Age	Gender	Genotype	Viral Load (IU/mL)	Neutralization titer (1/dilution)	
					VL	VC
1	65	M	1b	$2.29 \times 10^5$	100	100
2	27	F	1b	$9.7 \times 10^4$	100	3200
3	31	F	1b	$1.53 \times 10^5$	400	3200
4	47	M	3a	$1.02 \times 10^6$	20	20
5	58	M	1b	$1.15 \times 10^6$	100	3200
6	72	M	1b	$1.50 \times 10^6$	20	200
7	51	M	4	$4.38 \times 10^6$	20	20
8	69	F	1b	$9.7 \times 10^5$	20	400
9	36	F	1	$1.29 \times 10^5$	800	1600
10	46	M	1a	$1.05 \times 10^6$	100	800
11	55	M	1a	$1.54 \times 10^6$	400	3200
12	56	M	4c/4d	$2.41 \times 10^4$	20	800
13	56	F	4a	$1.09 \times 10^6$	100	400
14	59	F	1b	$3.54 \times 10^5$	200	800
15	62	M	1a	$3.37 \times 10^6$	20	20
16	50	M	4a	$1.48 \times 10^6$	20	200
17	46	M	4a	$4 \times 10^5$	20	200
18	70	F	1b	$1.3 \times 10^6$	100	800
19	77	F	1b	$6.2 \times 10^4$	20	100
20	61	F	1b	$2.58 \times 10^4$	200	800
21	46	F	1b	$2.11 \times 10^5$	100	400

## Figure legends

**Figure S1. Escape from neutralization by interfering antibodies.** Epitope II-specific-interfering non-neutralizing antibodies present in autologous serum were captured by VL epitope II peptide as described in Materials and Methods. Peptide or mock-treated samples were then tested for their ability to neutralize patient-derived HCVpp bearing VL or VC envelopes. The x-axis indicates the serum sample used in the assay at 1/400 dilution. The y-axis indicates entry expressed as percentage of HCVpp entry incubated with anti-HCV negative control serum (=100%).

**Figure S2. Bioinformatics analysis of HCV sequences from variants VL and VC.** Distribution of residues at positions 458 and 478 for HCV complete E2 sequences from all subtypes (black) and from subtype 1b only (white) within the European Hepatitis C Virus databases (Combet et al. 2007), (<http://euhcldb.ibcp.fr>). S is the predominant residue at position 458 (all: 94% for, 1b: 90.3%). The position 478 is variable (it belongs to HVR2) but R (all: 2.4% for, 1b: 10.8%) is more frequent than C (all: 0.2%, 1b: 0.9%). S and R residues are more frequently observed at positions 458 and 478, respectively.



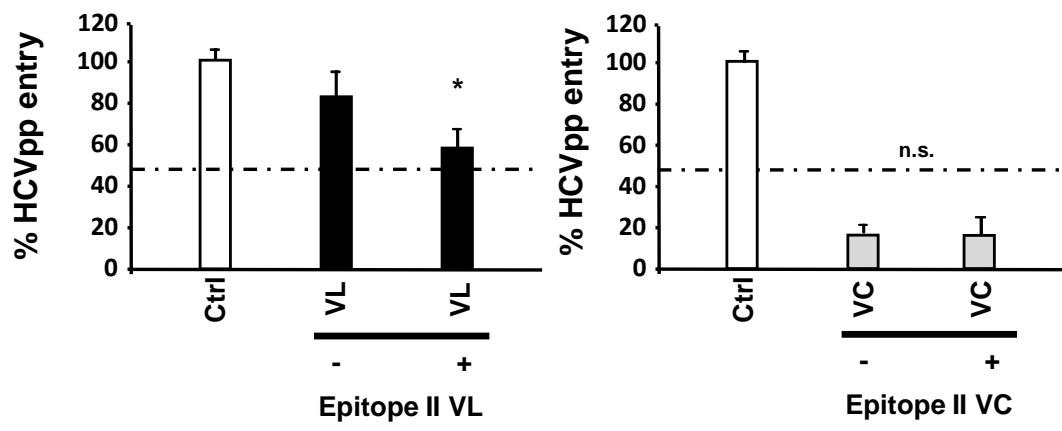


Figure S1

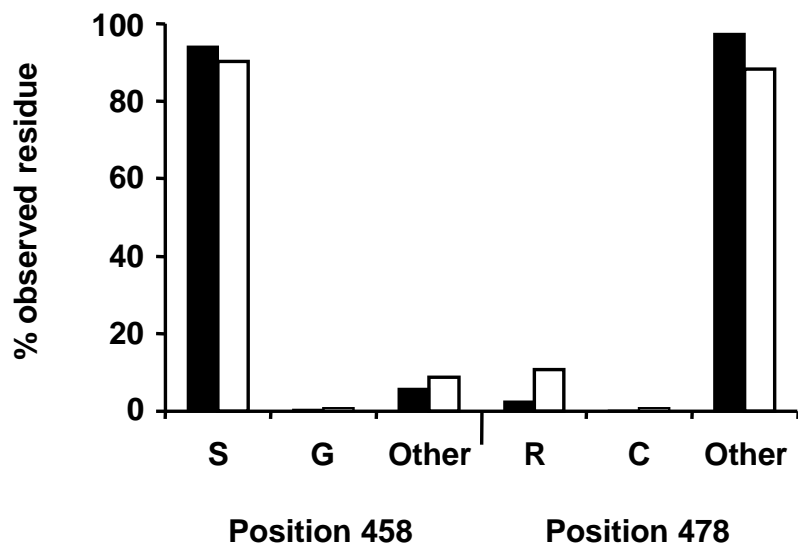


Figure S2

## **PARTIE III:**

# **PREVENTION DE LA REINFECTION PAR LE VHC PAR L'UTILISATION D'ANTICORPS MONOCLONAUX DIRIGES CONTRE LE FACTEUR DE L'HOTE CLAUDINE 1**

### **Publication n°3**

**Monoclonal anti-claudin 1 antibodies prevent hepatitis C virus infection of primary human hepatocytes**

*Gastroenterology*, 2010, volume 139, pages 953-964

---

Parmi les facteurs de l'hôte impliqués dans l'entrée virale, la protéine CLDN1 est essentielle pour l'infection par le VHC. A l'inverse des autres facteurs de l'hôte, CLDN1 est principalement exprimée au niveau du foie, faisant de cette protéine une cible prometteuse en tant que stratégie de prévention lors de la réinfection du greffon suite à la transplantation hépatique.

Le but de mon travail de thèse étant de valider le concept d'une immunothérapie passive pour empêcher la réinfection du greffon, je me suis particulièrement intéressée à l'action d'anticorps monoclonaux dirigés contre le facteur de l'hôte CLDN1, ayant précédemment montré l'importance des facteurs de l'hôte dans la sélection de variants viraux lors de la transplantation hépatique. De plus, il a pu être montré que des anticorps polyclonaux anti-CLDN1, développés au sein du laboratoire, étaient capables d'inhiber spécifiquement et de manière dose-dépendante l'infection du VHC en utilisant le modèle des VHCcc (Krieger et al. 2010). Ces anticorps inhibent l'attachement de la glycoprotéine d'enveloppe E2 et l'interaction CLDN1-CD81 (Krieger et al. 2010).

A la suite de cette étude, des anticorps monoclonaux dirigés contre les domaines extracellulaires de CLDN1 ont été produits par immunisation génétique de rats. La spécificité des anticorps monoclonaux obtenus a été confirmée par cytométrie en flux sur des cellules CHO transfectées pour exprimer CLDN1, sur des cellules de lignées hépatocytaires humaines (Huh7.5) et sur des hépatocytes primaires humains exprimant de manière naturelle la protéine de jonction CLDN1 à leur surface. Nous avons sélectionné 6 anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine d'intérêt pour leur capacité à inhiber l'entrée de VHCpp et de VHCcc. Nos résultats suggèrent que les anticorps monoclonaux anti-CLDN1 de rats produits reconnaissent spécifiquement les domaines extracellulaires de la protéine CLDN1. Nous avons ensuite testé la capacité des ces anticorps à inhiber l'entrée du VHC dans sa cellule hôte en effectuant des tests d'infection par des VHCpp sur les lignées hépatocytaires Huh7.5 et sur des hépatocytes primaires humains en présence ou en absence d'anticorps anti-CLDN1. Nous avons ainsi pu montrer que les anticorps monoclonaux dirigés contre CLDN1 inhibent de manière spécifique tous les génotypes du VHC. Nous avons aussi montré que ces anticorps sont capables d'inhiber efficacement les VHCpp exprimant les glycoprotéines d'enveloppe des variants viraux résistants à la neutralisation par le sérum autologue lors de la transplantation hépatique. L'ensemble de ces résultats suggère qu'en ciblant l'étape de l'entrée du virus dans l'hépatocyte avec un anticorps monoclonal dirigé contre le facteur de l'hôte CLDN1, on pourrait prévenir la réinfection du greffon par le VHC.

# BASIC—LIVER, PANCREAS, AND BILIARY TRACT

## Monoclonal Anti-Claudin 1 Antibodies Prevent Hepatitis C Virus Infection of Primary Human Hepatocytes

ISABEL FOFANA,<sup>\*,‡</sup> SOPHIE E. KRIEGER,<sup>\*,‡</sup> FRITZ GRUNERT,<sup>§</sup> SANDRA GLAUBEN,<sup>§</sup> FEI XIAO,<sup>\*,‡</sup> SAMIRA FAFI-KREMER,<sup>\*,‡</sup> ERIC SOULIER,<sup>\*,‡</sup> CATHY ROYER,<sup>\*,‡</sup> CHRISTINE THUMANN,<sup>\*,‡</sup> CHRISTOPHER J. MEE,<sup>||</sup> JANE A. MCKEATING,<sup>||</sup> TATJANA DRAGIC,<sup>||</sup> PATRICK PESSAU,<sup>#</sup> FRANCOISE STOLL-KELLER,<sup>\*,‡</sup> CATHERINE SCHUSTER,<sup>\*,‡</sup> JOHN THOMPSON,<sup>§</sup> and THOMAS F. BAUMERT<sup>\*,‡,\*\*\*</sup>

<sup>\*</sup>Inserm, U748, Strasbourg, France; <sup>‡</sup>University of Strasbourg, Strasbourg, France; <sup>§</sup>Genovac GmbH, Freiburg, Germany; <sup>||</sup>Hepatitis C Research Group, Institute for Biomedical Research, University of Birmingham, Birmingham, United Kingdom; <sup>||</sup>Department of Microbiology and Immunology, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, New York; <sup>#</sup>Pôle des Pathologies Digestives, Hépatiques et Transplantation, and <sup>\*\*\*</sup>Pôle Hépatodigestif, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

**BACKGROUND & AIMS:** Hepatitis C virus (HCV) infection is a challenge to prevent and treat because of the rapid development of drug resistance and escape. Viral entry is required for initiation, spread, and maintenance of infection, making it an attractive target for antiviral strategies. The tight junction protein claudin-1 (CLDN1) has been shown to be required for entry of HCV into the cell. **METHODS:** Using genetic immunization, we produced 6 monoclonal antibodies against the host entry factor CLDN1. The effects of antibodies on HCV infection were analyzed in human cell lines and primary human hepatocytes. **RESULTS:** Competition and binding studies demonstrated that antibodies interacted with conformational epitopes of the first extracellular loop of CLDN1; binding of these antibodies required the motif W(30)-GLW(51)-C(54)-C(64) and residues in the N-terminal third of CLDN1. The monoclonal antibodies against CLDN1 efficiently inhibited infection by HCV of all major genotypes as well as highly variable HCV quasispecies isolated from individual patients. Furthermore, antibodies efficiently blocked cell entry of highly infectious escape variants of HCV that were resistant to neutralizing antibodies. **CONCLUSIONS: Monoclonal antibodies against the HCV entry factor CLDN1 might be used to prevent HCV infection, such as after liver transplantation, and might also restrain virus spread in chronically infected patients.**

**Keywords:** Antiviral; Genetic Barrier; Host Factor; Receptor; Treatment.

Hepatitis C virus (HCV) is a major cause of cirrhosis and hepatocellular carcinoma worldwide.<sup>1</sup> Current antiviral treatment consisting of pegylated interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) and ribavirin is limited by resistance, adverse effects, and high costs.<sup>2</sup> Although the clinical development of novel antivirals targeting HCV protein processing has been shown to improve sustained virological

response, toxicity of the individual compounds and development of viral resistance remain major challenges.<sup>3</sup>

The absence of strategies for prevention of HCV infection is a major problem for patients undergoing liver transplantation for HCV-related end-stage liver disease.<sup>1</sup> Because of viral evasion from host immune responses and immunosuppressive therapy, reinfection of the graft is universal and characterized by accelerated progression of liver disease.<sup>1,4</sup> Recurrent HCV liver disease in the graft with poor outcome has become an increasing problem facing hepatologists and transplant surgeons. Thus, novel antiviral preventive and therapeutic strategies are urgently needed.<sup>5</sup>

HCV entry into target cells is a promising target for antiviral preventive and therapeutic strategies<sup>6,7</sup> because it is essential for initiation, spread, and maintenance of infection.<sup>6,7</sup> Furthermore, cross-neutralizing antibodies inhibiting HCV entry have been shown to be associated with control of HCV infection and prevention of HCV reinfection in cohorts with self-limited acute infection.<sup>8,9</sup>

HCV entry is a multistep process involving several host factors including heparan sulfate,<sup>10</sup> CD81,<sup>11</sup> scavenger receptor B1,<sup>12</sup> claudin-1 (CLDN1),<sup>13</sup> and occludin.<sup>14</sup> Among the host cell entry factors, tight junction (TJ) protein CLDN1 is a promising antiviral target because it is essential for HCV entry, and, to date, there is no evidence for CLDN1-independent HCV entry.<sup>13,15</sup> Fur-

**Abbreviations used in this paper:** CLDN, claudin; CMFDA, 5-chloromethylfluorescein di-acetate; CTRL, control; EL1, extracellular loop 1; HA-tag, hemagglutinin-tag; HCV, hepatitis C virus; HCVcc, cell culture-derived HCV; HCVpp, HCV pseudoparticles; IC<sub>50</sub>, 50% inhibitory concentration; IgG, immunoglobulin G; K<sub>d</sub>, dissociation constant; mAb, monoclonal antibody; MFI, mean fluorescence intensity; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; PHH, primary human hepatocytes; TJ, tight junction.

© 2010 by the AGA Institute  
0016-5085/\$36.00  
doi:10.1053/j.gastro.2010.05.073

thermore, CLDN1 has been suggested to play an important role in cell-cell transmission.<sup>16</sup> In contrast to other HCV entry factors such as CD81 or scavenger receptor BI, CLDN1 is predominantly expressed in the liver.<sup>17</sup> CLDN1 is also expressed in the kidney.<sup>17</sup>

To date, the exploration of CLDN1 as an antiviral target has been hampered by the lack of antibodies targeting surface expressed epitopes.<sup>13</sup> In this study, we demonstrate for the first time successful production of anti-CLDN1 monoclonal antibodies (mAbs) that inhibit HCV infection. These results suggest that targeting CLDN1 with specific mAbs may constitute a novel antiviral approach to prevent primary HCV infection, such as after liver transplantation, and might also restrain virus spread in chronically infected patients.

## Materials and Methods

### Primary Hepatocytes and Cell Lines

Culture of primary human hepatocytes (PHH),<sup>18</sup> human hepatoma cell lines (Huh7.5.1),<sup>19</sup> and HepG2,<sup>20</sup> human embryonic kidney cell lines (HEK293T),<sup>9</sup> and BOSC23, and Chinese hamster ovary (CHO) cells<sup>18</sup> has been described.

### Production and Screening of anti-CLDN1 mAbs

Anti-CLDN1 mAbs were raised by genetic immunization of Wistar rats using a eukaryotic expression vector encoding the full-length human CLDN1 complementary DNA according to proprietary GENOVAC technology (GENOVAC GmbH, Freiburg, Germany). Following completion of immunization, antibodies were selected by flow cytometry for their ability to bind to human CLDN1 expressed on the cell surface of nonpermeabilized HEK293T and BOSC23 cells and CHO cells, which had been transfected with pCMV-SPORT6/CLDN1. For imaging studies, Huh7.5.1 cells were stained with rat isotype control or anti-CLDN1 mAb OM-4A4-D4 (10  $\mu$ g/mL) and analyzed as described.<sup>18</sup>

### Epitope Mapping

Competition between anti-CLDN1 mAbs for cellular binding was measured by a cell-based enzyme-linked immunosorbent assay and labeled antibodies: Huh7.5.1 cells were incubated for 60 minutes with 0.1  $\mu$ g/mL biotinylated anti-CLDN1 mAb (Sulfo-NHS-LC-Biotin; Thermo Scientific, Illkirch, France) together with increasing concentrations of unlabeled anti-CLDN1 mAbs as competitors. Following washing with phosphate-buffered saline, binding of biotinylated antibody was detected by incubation with streptavidin labeled with horseradish peroxidase. Curves determined by measurement of binding in the presence of an isotype-matched control were compared with those determined in the presence of the competing antibody. Epitope mapping was performed using plasmids encoding for CLDN1 containing defined mutations and a cytoplas-

mic N-terminal hemagglutinin-tag (HA-tag).<sup>21</sup> To study binding of anti-CLDN1 mAbs to mutant CLDN1, binding of mAb OM-7D3-B3 to BOSC23 transfected with CLDN1 expression constructs was determined by flow cytometry. Flow cytometric quantitation of HA-tag expression using an anti-HA antibody (Covance, Münster, Germany) served as internal control. The transfected cells were either permeabilized with Cytoperm/Cytofix (BD Biosciences, Heidelberg, Germany) for analysis of cytoplasmic HA-tag expression or untreated for analysis of anti-CLDN1-mutant CLDN1 interactions. For fluorescence-activated cell sorter analysis, transfected cells were incubated with 20  $\mu$ g/mL anti-CLDN1 mAb or anti-HA for 30 minutes followed by incubation with 10  $\mu$ g/mL anti-rat immunoglobulin G (IgG) mAb (for anti-CLDN1) or 10  $\mu$ g/mL anti-mouse IgG mAb labeled with phycoerythrin (for anti-HA). The half-saturating concentrations (apparent  $K_d$  [antibody disassociation constant]) were determined as described.<sup>22</sup>

### Cell Culture-Derived HCV and HCV Pseudoparticles Production and Infection

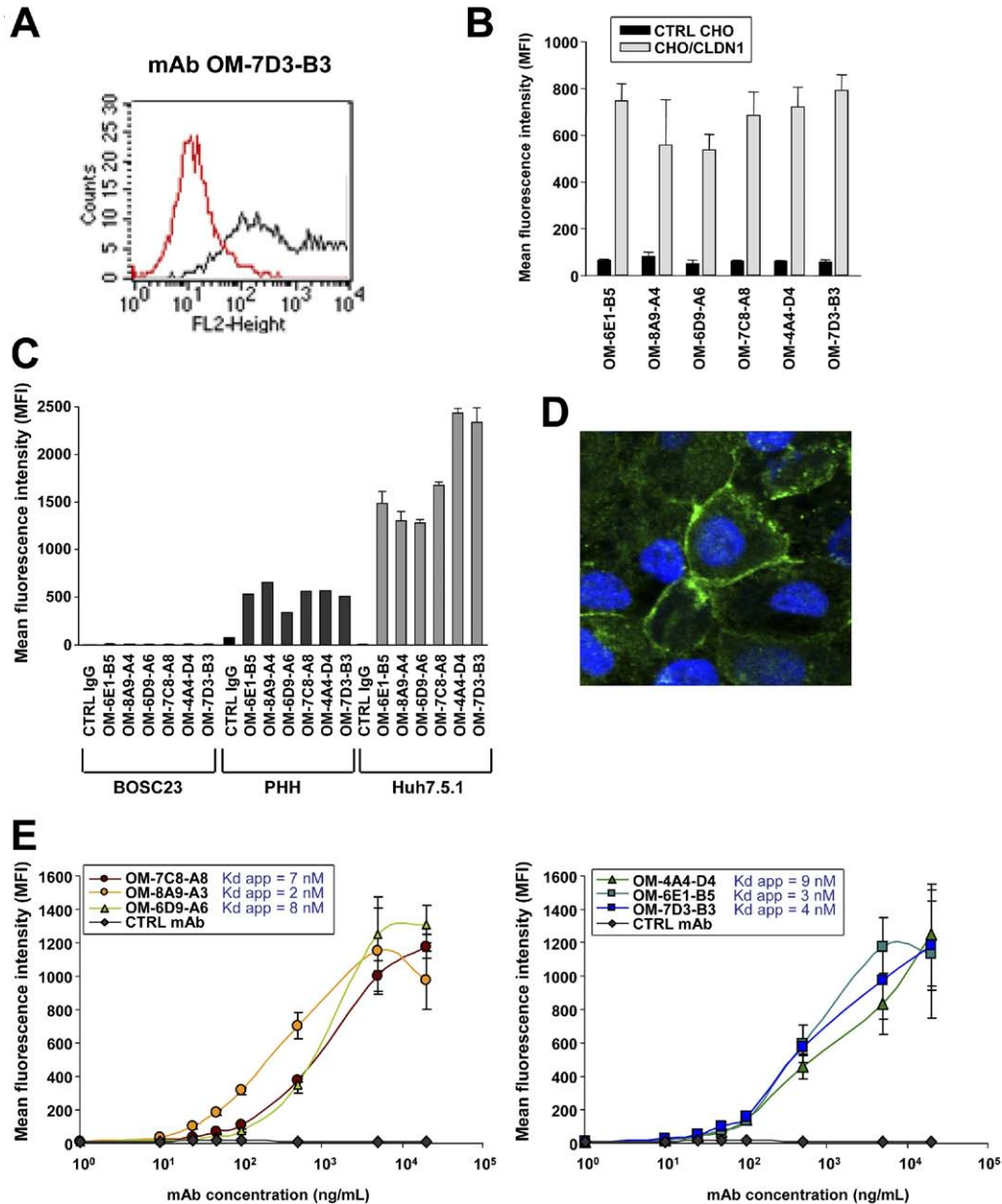
Cell culture-derived HCV (HCVcc) (Luc-Jc1, Luc-Con1),<sup>23</sup> HCV pseudoparticles (HCVpp) (strains H77, HCV-J, JFH1, UKN3A1.28, UKN4.21.16, UKN5.14.4, UKN6.5.340, P01VL, P02VH, P02VI, P02VJ, P03VC, P04VC, P04VD, P04VE, P05VD, P05VE, P05VF, P06VG, P06VH, P06VI)<sup>24</sup> and vesicular stomatitis virus pseudoparticles (VSVpp) were produced as described.<sup>24</sup> Patient-derived HCVpp were produced from 6 patients (P01–P06) undergoing liver transplantation using full-length E1E2 expression constructs generated from circulating HCV as described.<sup>9,24</sup> Huh7.5.1, Huh7 cells, or PHH were preincubated with antibodies for 1 hour and incubated for 4 hours at 37°C with HCVcc or HCVpp. Viral infection was analyzed as described.<sup>18,23</sup> For antibody-mediated neutralization, HCVpp were preincubated with autologous anti-HCV serum,<sup>24</sup> anti-E2 mAb (IGH461; Innogenetics, Gent, Belgium),<sup>25</sup> and anti-HCV IgG purified from a chronically infected patient as described.<sup>25,26</sup>

### Toxicity Assays

Cytotoxic effects on cells were assessed by analyzing the ability to metabolize 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) as described previously.<sup>27</sup> Huh7.5.1 cells and PHH from 3 different donors were preincubated with isotype control, anti-CLDN1 OM-7D3-B3 mAbs, anti-Fas (Beckman Coulter, Marseille, France), flavopiridol (Sigma, Taufkirchen, Germany), or compound C (Sigma). TJ integrity was analyzed as described.<sup>20</sup>

### Statistical Analysis

Results are expressed as means  $\pm$  standard deviation (SD). Statistical analyses were performed using Student *t* test, with a *P* value of  $<.05$  being considered statistically significant.



**Figure 1.** Production of CLDN1-specific mAbs with high affinity to HCV permissive cells lines and human hepatocytes. (A) Specific binding of rat anti-human CLDN1 mAb OM-7D3-B3 (20  $\mu$ g/mL) to CLDN1 expressed on the cell surface of BOSC23 cells transfected with pCMV-SPORT6-CLDN1 (black histogram) but not to cells transfected with control vector (pCMV-SPORT6; red histogram). mAb binding was revealed by flow cytometry using PE-conjugated anti-rat IgG mAb. The x- and y-axes show mean fluorescence intensities and relative numbers of stained cells, respectively. (B) Specific binding of anti-CLDN1 mAbs (20  $\mu$ g/mL) to human CLDN1 expressed on the cell surface of transfected CHO cells. CHO cells were transfected with pCMV-SPORT6-CLDN1 (grey bars) or control vector (pCMV-SPORT6; black bars). The mean fluorescence intensities (MFIs) for each experiment performed in triplicate are shown. (C) Binding of mAbs to Huh7.5.1 cells and primary human hepatocytes (PHH) was determined by flow cytometry as described above. (D) Staining of cell surface CLDN1 on Huh7.5.1 cells by anti-CLDN1 mAb OM-4A4-D4 was performed as described in Materials and Methods section. Cell nuclei were stained with DAPI. (E) Binding properties of anti-CLDN1 mAbs to Huh7.5.1 cells. Cells were incubated with increasing concentrations of anti-CLDN1 mAbs. MAb binding was revealed by flow cytometry using PE-conjugated anti-rat IgG mAb. As a control, isotype-matched rat IgG2 was used. Mean fluorescence intensities compared with experiments with isotype control antibody are shown. Apparent  $K_d$  are shown in the key.

**Results**

**Production of anti-CLDN1 mAbs With High Affinity to CLDN1 Expressed on Human Hepatocytes**

To explore CLDN1 as a target for antiviral strategies, we generated anti-CLDN1 mAbs by genetic immunization using a full-length CLDN1 complementary DNA expression vector. Genetic immunization generated 6 mAbs that reacted with native human CLDN1 expressed on BOSC23 and CHO cells, showing negligible staining of parental cells (Figure 1A and B). Analyses of the antibody isotypes revealed IgG2a and IgG2b with a  $\kappa$

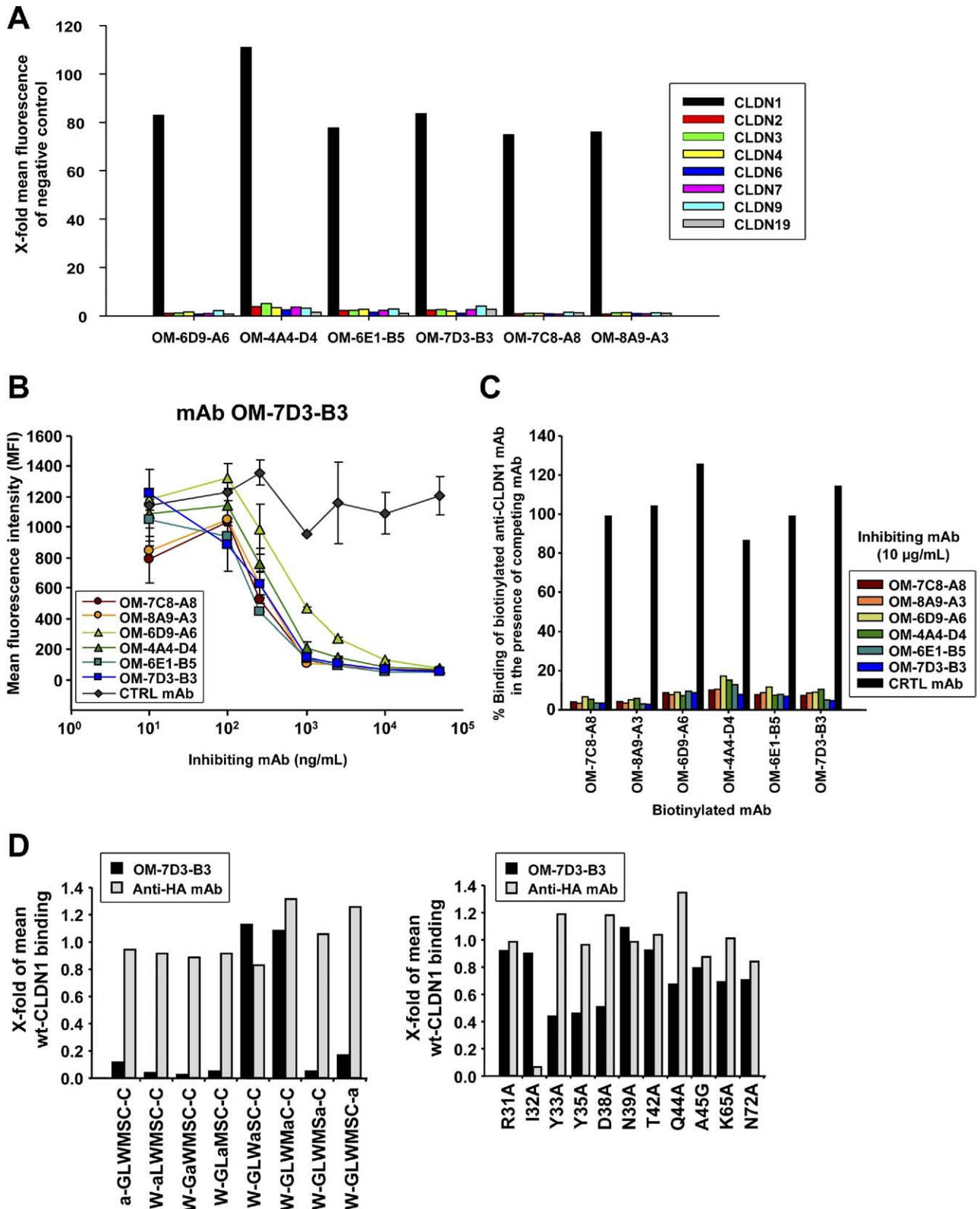
nization using a full-length CLDN1 complementary DNA expression vector. Genetic immunization generated 6 mAbs that reacted with native human CLDN1 expressed on BOSC23 and CHO cells, showing negligible staining of parental cells (Figure 1A and B). Analyses of the antibody isotypes revealed IgG2a and IgG2b with a  $\kappa$



light chain. All of the mAbs bound to the surface of Huh7.5.1 cells and PHH (Figure 1C and D).

Next, we characterized the binding properties of anti-CLDN1 mAbs to PHH and Huh7.5.1 cells (Figure 1E). The

half-saturating concentrations for binding (corresponding to the apparent  $K_d$ ) were in the low nanomolar range demonstrating that anti-CLDN1 mAbs produced by genetic immunization bind with high affinity to CLDN1 expressed



BASIC-LIVER,  
PANCREAS, AND  
BILIARY TRACT



on human hepatocytes and Huh7.5.1 hepatoma cells (K<sub>d</sub> OM-7C8-A8, 7 nmol/L; OM-8A9-A3, 2 nmol/L; OM-6D9-A6, 8 nmol/L; OM-4A4-D4, 9 nmol/L; OM-6E1-B5, 3 nmol/L; OM-7D3-B3, 4 nmol/L).

Because anti-CLDN1 mAbs failed to stain primary mouse hepatocytes but bound to primary hepatocytes of *Macaca fascicularis* (data not shown), it is likely that the epitopes targeted by the antibodies are conserved among primates but different in rodents. Negligible staining of CLDN1 deficient cells transfected to express human CLDN2, 3, 4, 6, 7, 9, 11, 12, 15, 17, and 19 suggests specific interaction of the mAbs with CLDN1 but not with other members of the CLDN family (Figure 2A and Supplementary Figure S1).

**Anti-CLDN1 mAbs Bind to Conformational Epitopes in CLDN1 Extracellular Loop 1 Comprising Motif W(30)-GLW(51)-C(54)-C(64)**

To investigate whether the 6 different anti-CLDN1 mAbs recognize similar or unrelated epitopes, we performed cross-competition experiments with the mAbs. Labeled anti-CLDN1 mAb OM-7D3-B3 was incubated with Huh7.5.1 cells in the presence of increasing concentrations of the 5 remaining unlabeled anti-CLDN1 mAbs. All of the unlabeled mAbs reduced the binding of OM-7D3-B3. In contrast, the isotype control mAb had no effect (Figure 2B). Similar results were obtained for cross-competition experiments with labeled versions of the other mAbs (Figure 2C). The mutual cross competition between all 6 mAbs suggests that they recognize similar epitopes on CLDN1.

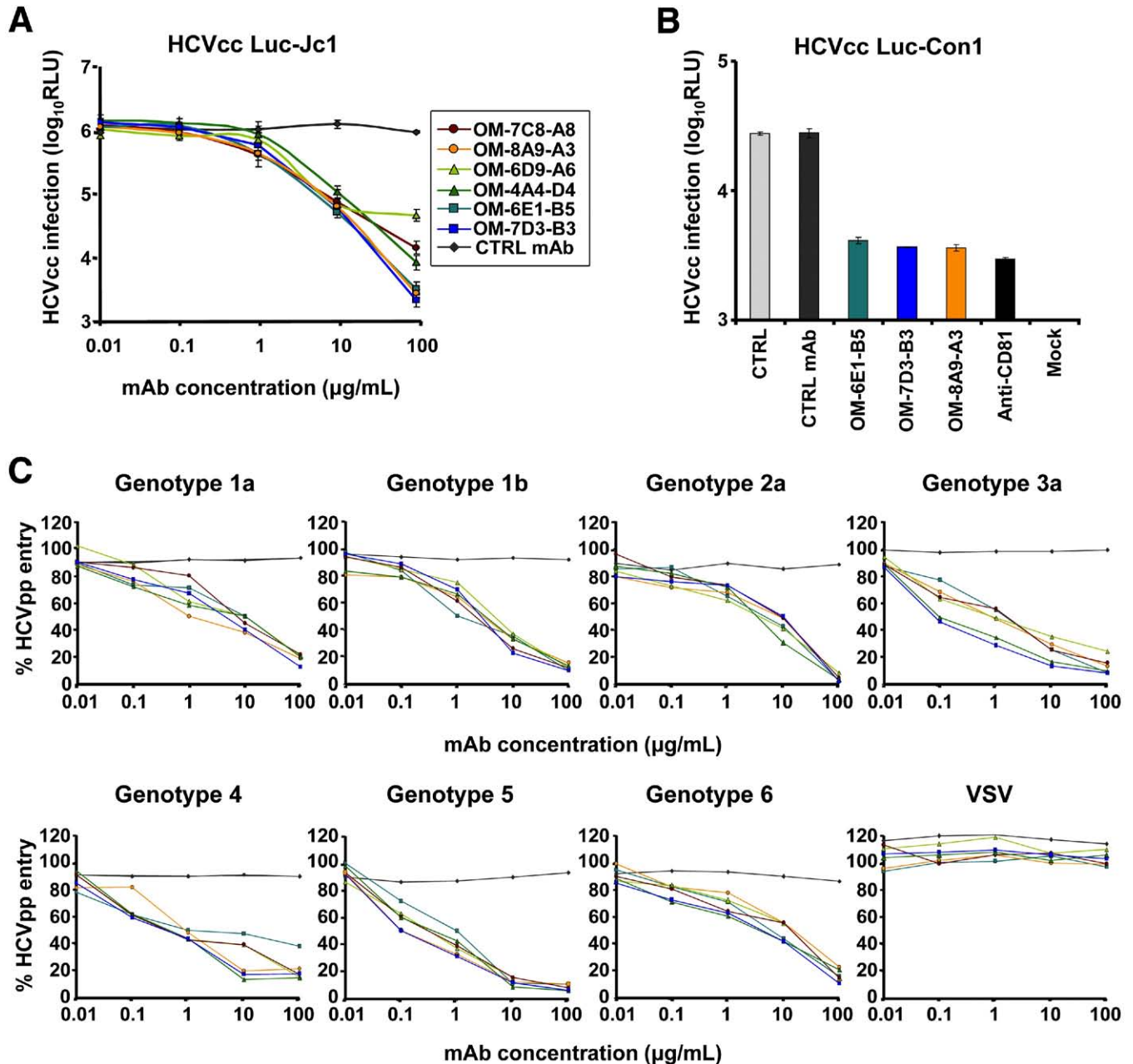
To define further the motif(s) targeted by the mAbs, we studied the interaction of the mAb OM-7D3-B3 with a panel of CLDN1 mutants.<sup>21</sup> Using an alanine scanning mutagenesis approach, Cukierman et al identified residues in the highly conserved claudin motif W(30)-GLW(51)-C(54)-C(64) within the first extracellular loop that are critical for HCV entry.<sup>21</sup> To investigate whether this motif is recognized by anti-CLDN1 mAbs, CLDN1-deficient BOSC23 cells were transfected to express CLDN1 mutants, and binding of anti-CLDN1 OM-7D3-B3 was an-

alyzed by flow cytometry. CLDN1 mutants contained alanine substitutions of critical residues in the highly conserved claudin motif (Figure 2D, left panel) as well as single alanine substitutions at positions occupied by bulky, charged, or polar residues in the CLDN1 N-terminal region (Figure 2D, right panel). To monitor correct protein expression, mutant CLDN1 proteins contained an HA-tag (Figure 2D). Mutation of amino acid residues at positions 30, 33, 35, 49, 50, 51, 54, and 64 of CLDN1 reduced OM-7D3-B3 binding to CLDN1 mutants, whereas the other mutations had a minimal effect (Figure 2D). These results suggest that the antibody OM-7D3-B3 recognizes conformation-dependent epitopes in CLDN1 extracellular loop 1 (EL1) that are dependent on the W(30)-GLW(51)-C(54)-C(64) motif as well as residues in the N-terminal third of EL1.

**Cross Inhibition of Infection of HCV Isolates From all Major Genotypes**

To investigate whether the antibodies produced by genetic immunization inhibit HCV infection, Huh7.5.1 cells were infected with chimeric luciferase reporter viruses Luc-Con1 (HCV structural proteins of genotype 1b) and Luc-Jc1 (genotype 2a).<sup>23</sup> Figure 3A shows that anti-CLDN1 mAbs inhibit Luc-Jc1 infection of Huh7.5.1 cells in a dose-dependent manner (50% inhibitory concentration [IC<sub>50</sub>], 1–6 μg/mL). In contrast, an isotype control mAb had no effect. Comparable results were obtained for Luc-Con1 (Figure 3B), suggesting that inhibition of HCV infection was not dependent on the viral genotype. To investigate whether anti-CLDN1 mAbs were effective against different HCV envelope glycoproteins, we analyzed their inhibition of HCVpp bearing envelope glycoproteins from HCV genotypes 1–6. All of the anti-CLDN1 mAbs inhibited the infectivity of HCVpp from genotypes 1–6 in a dose-dependent manner (IC<sub>50</sub>, 0.1–5 μg/mL; Figure 3C). A similar inhibition of HCVpp infection was observed in PHH (Supplementary Figure S2). Inhibition of HCV infection was confirmed using whole HCV derived from patient serum (Supplementary Figure S3). Taken to-

**Figure 2.** Mapping of CLDN1 epitopes targeted by mAbs. (A) Negligible binding of anti-CLDN1 mAb to other members of the CLDN family. BOSC23 cells were transfected with validated CLDN expression constructs, and binding of anti-CLDN1 mAbs to cell surface CLDN was analyzed by flow cytometry. Specific binding is expressed in mean fluorescence intensity (MFI) relative to negative control. (B and C) Competition of anti-CLDN1 mAbs for cellular binding. Huh7.5.1 cells were incubated with 0.1 μg/mL biotinylated anti-CLDN1 mAb OM-7D3-B3 together with increasing (B) or saturating concentrations (C) of unlabeled anti-CLDN1 mAbs as competitors. Following washing of cells in phosphate-buffered saline (PBS), binding of labeled antibody was detected as described in Materials and Methods section and is shown as mean fluorescence intensities (B) or % binding of biotinylated anti-CLDN1 mAb in the presence of competing mAb (C). (D) Epitope mapping. Mapping studies were performed using plasmids expressing CLDN1 containing an hemagglutinin-tag (HA-tag) and defined mutations indicated on the x-axis: the left panel shows mutants containing alanine substitutions of critical residues in the highly conserved claudin motif W(30)-GLW(51)-C(54)-C(64)<sup>21</sup>; the right panel shows single alanine substitutions at positions occupied by bulky, charged, or polar residues.<sup>21</sup> CLDN1-negative BOSC23 cells were transfected with mutant CLDN1 expression constructs, and binding of mAb OM-7D3-B3 was analyzed by flow cytometry. MAb binding to mutant CLDN1 relative to binding to wild-type CLDN1 is shown (black bars). Proper expression of CLDN1 proteins was confirmed by flow cytometric analysis of HA-tag expression using an anti-HA antibody (grey bars) except for mutant I32A where the HA-tag was absent and expression of CLDN1 was confirmed by fluorescence-activated cell sorter analysis using an unrelated anti-CLDN1 antibody (data not shown). Binding of anti-HA antibody to HA of mutant CLDN1 relative to HA of wild-type CLDN1 is shown as internal control for expression of mutant CLDN1 (grey bars).



**Figure 3.** Genotype-independent inhibition of HCVcc and HCVpp infection by anti-CLDN1 mAbs. (A and B) Inhibition of HCVcc infection by anti-CLDN1 mAbs. Huh7.5.1 cells were preincubated with increasing (A) or a fixed (10 µg/mL) (B) concentration of anti-CLDN1 or control mAbs for 1 hour at 37°C before infection with Luc-Jc1 or Luc-Con1 HCVcc. HCV infection was assessed as described in Methods. (C) Inhibition of infection of HCVpp bearing envelope glycoproteins from genotypes 1–6. Huh7 cells were preincubated with antibodies as described in A before infection with HCVpp. MLV-based HCVpp bearing envelope glycoproteins of strains H77 (*genotype 1a*), HCV-J (*1b*), JFH1 (*2a*), UKN3A1.28 (*3a*), UKN4.21.16 (*4*), UKN5.14.4 (*5*), UKN6.5.340 (*6*), and VSVpp were produced as described in Materials and Methods section. Means ± standard deviations from 3 experiments are shown, respectively.

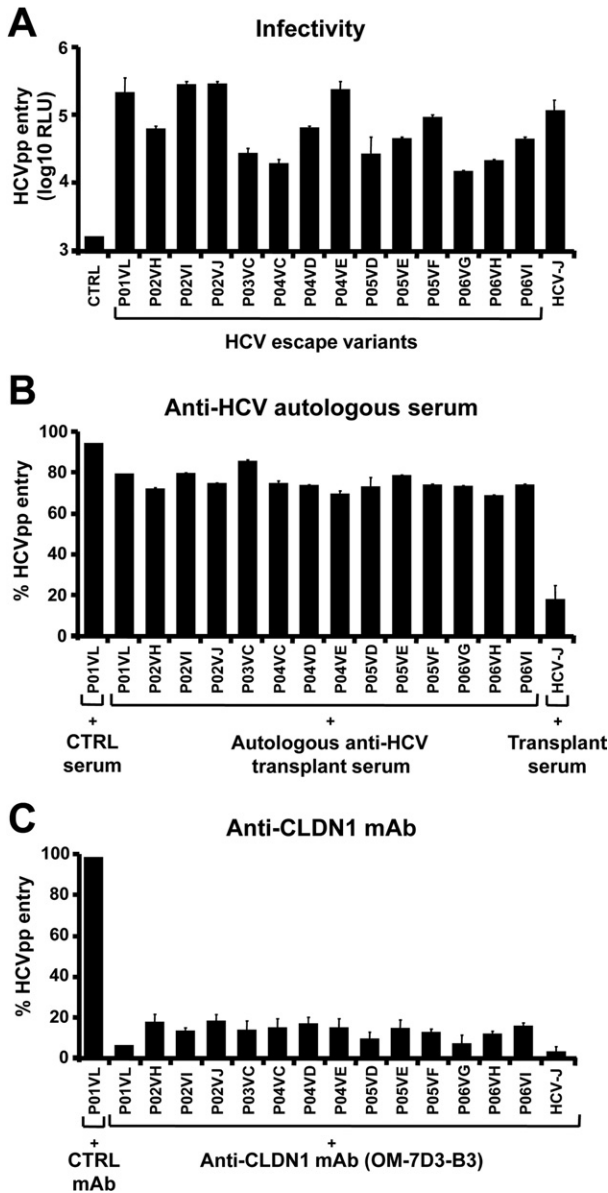
gether, these data demonstrate that anti-CLDN1 mAbs efficiently inhibit HCV infection of all major genotypes.

#### *Inhibition of Infection of HCV Variants Escaping Autologous Neutralizing Antibodies and Reinfesting the Liver Graft*

End-stage liver disease because of chronic HCV infection is a leading cause for liver transplantation. Using

PHH and HCVpp bearing viral envelope glycoproteins derived from HCV-infected patients undergoing liver transplantation, we previously demonstrated that enhanced viral entry and escape from autologous antibody-mediated neutralization are key determinants for the selection of viral variants during HCV reinfection of the liver graft.<sup>24</sup>

To assess whether anti-CLDN1 mAbs inhibit infection by HCV escape variants, we investigated the effect of



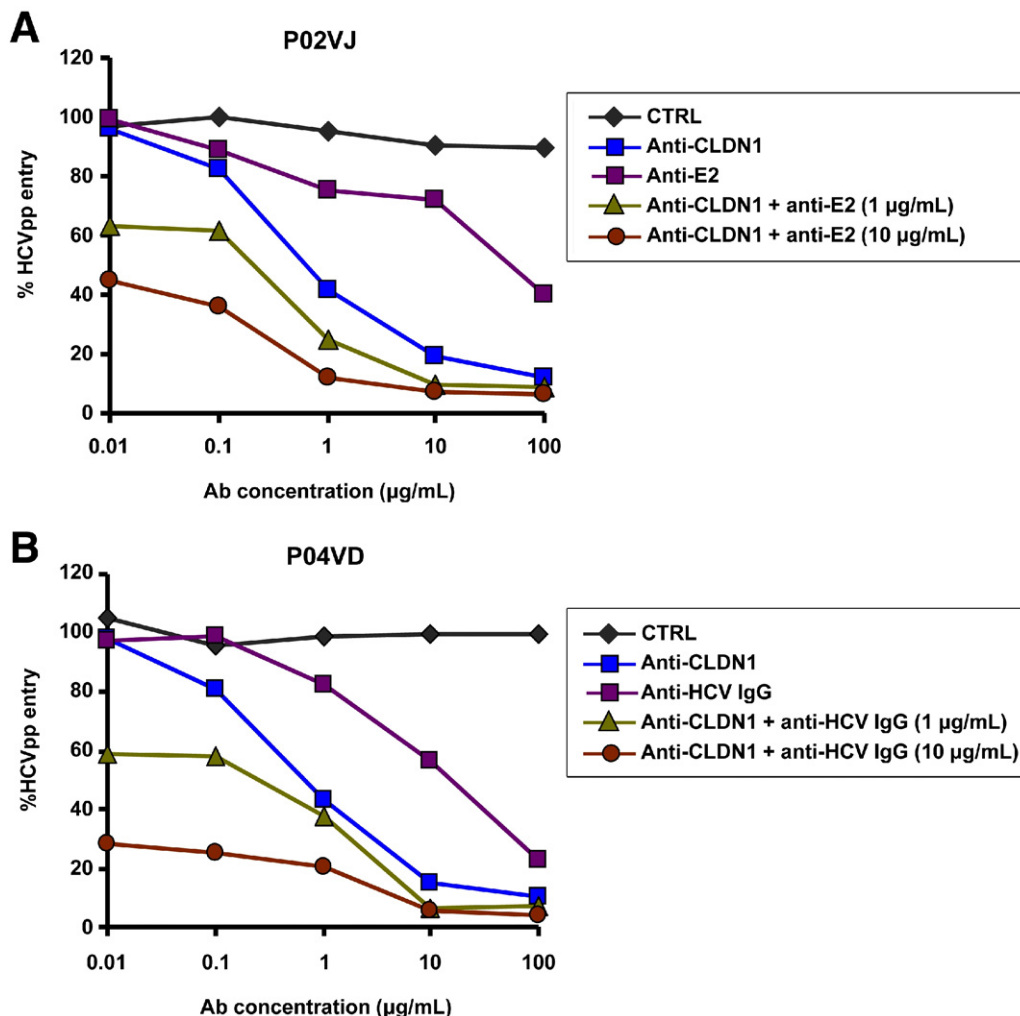
**Figure 4.** Efficient inhibition of infection of HCV variants escaping autologous neutralizing antibodies and re-infecting the liver graft by anti-CLDN1 mAbs. HIV-based HCVpp bearing envelope glycoproteins from HCV escape variants derived from 6 patients undergoing liver transplantation (P01VL, P02VH, P02VI, P02VJ, P03VC, P04VC, P04VD, P04VE, P05VD, P05VE, P05VF, P06VG, P06VH, P06VI)<sup>24</sup> were produced from patient-derived full-length E1E2 expression constructs as described.<sup>9</sup> (A) Infectivity of HCV escape variants. HCVpp were added to PHH, and infection was analyzed as in Figure 3. Results are expressed in relative light units (RLU) plotted in a logarithmic scale. (B) Escape of HCVpp infection from neutralization by autologous pretransplant serum. HCVpp were incubated with autologous pretransplant anti-HCV positive serum or control anti-HCV negative serum (CTRL), and HCVpp infection in PHH was analyzed as described in Supplementary Figure 1. As a positive control, HCVpp bearing envelope glycoproteins from a heterologous strain (HCV-J) were incubated with pretransplant serum at the same dilution. (C) Inhibition of infection of viral escape variants and HCV-J by anti-CLDN1 mAb OM-7D3-B3. PHH were preincubated with anti-CLDN1 or isotype control mAbs (25 μg/mL), and infection was analyzed as described above. Means ± standard deviation from a representative experiment performed in triplicate are shown.

anti-CLDN1 mAbs on entry of HCVpp bearing envelope glycoproteins from highly infectious HCV strains selected during transplantation and re-infecting the liver graft.<sup>24</sup> As shown in Figure 4, preincubation of PHH with anti-CLDN1 mAbs inhibited entry of patient-derived HCVpp in PHH (Figure 4C), which were only poorly neutralized by antibodies present in autologous pretransplant serum (Figure 4B). Similar results were obtained using PHH from different donors (data not shown). These data demonstrate that anti-CLDN1 mAbs specifically inhibit entry of HCV escape variants that are resistant to autologous host responses and re-infect the liver graft.

Recent studies have shown that cross-neutralizing anti-E2 antibodies or purified heterologous anti-HCV IgG obtained from HCV-infected patients are capable of neutralizing genetically diverse HCV isolates and could protect against HCV quasispecies challenge.<sup>28,29</sup> To investigate whether the combination of anti-envelope and anti-receptor antibodies results in an additive effect on the inhibition of HCV infection, we preincubated patient-derived HCVpp with anti-E2 mAb IGH461 (Figure 5A) or purified heterologous anti-HCV IgG (Figure 5B) and studied their ability to inhibit HCVpp infection in cells preincubated with anti-CLDN1 mAbs. Combination of antiviral and anti-receptor antibodies resulted in a marked additive effect, decreasing the IC<sub>50</sub> of anti-CLDN1 up to 100-fold (Figure 5).

**Anti-CLDN1 mAbs Inhibit Entry of Highly Variable HCV Quasispecies From Patients With Chronic Hepatitis C**

A major challenge for the development of antiviral strategies is the high variability of the virus. HCV has a high replication rate, and the highly error prone viral polymerase allows for rapid production of minor viral variants called “quasispecies” that may outpace humoral and cellular immune responses.<sup>26,30</sup> These variants are under constant immune pressure in the infected host, and selection processes lead to domination of the viral quasispecies by the fittest virus that can evade immune recognition or confer resistance to antiviral therapies or antiviral antibodies. To investigate whether anti-CLDN1 mAbs can inhibit the variants within a quasispecies population within chronically infected patients, we cloned, sequenced, and expressed the envelope glycoproteins of an individual patient chronically infected with HCV (Figure 6). Anti-CLDN1 mAbs broadly inhibited HCV infection of HCVpp bearing highly variable envelope glycoproteins from patient-derived quasispecies (Figure 6). A similar inhibition of infection of HCV quasispecies was obtained for a second patient chronically infected with HCV (data not shown).



**Figure 5.** Additive effect of antiviral and anti-CLDN1 antibodies on inhibition of HCV infection. HCVpp of strains P02VJ and P04VJ (see Figure 4) were preincubated with anti-E2 mAb IGH461 (A) or purified heterologous anti-HCV IgG (1 or 10 µg/mL) obtained from an unrelated chronically infected subject (B) or isotype control IgG for 1 hour at 37°C and added to Huh7 cells preincubated with serial dilutions of anti-CLDN1 OM-7D3-B3 or rat isotype control mAbs. HCVpp infection was analyzed as described in Figure 3.

### Absent Toxic Effects of Anti-CLDN1 mAbs in PHH

To address potential toxic effects of anti-CLDN1 mAbs, we performed cell viability analysis in PHH and Huh7.5.1 cells based on MTT testing. Following incubation of hepatoma cells and PHH with anti-CLDN1, no toxic effects were observed (Figure 7A–D). In contrast, preincubation of cells with flavopiridol, compound C, and anti-Fas antibody resulted in easily detectable toxicity (Figure 7A–D). CLDN1 is an important structural component of TJ.<sup>17</sup> To investigate whether anti-CLDN1 mAbs alter TJ function, we studied their effect on TJ integrity and permeability in a well-characterized TJ functional assay based on polarized hepatoma cells.<sup>20</sup> As shown in Figure 7E, the capacity of bile canaliculi lumens to retain 5-chloromethylfluorescein di-acetate (CMFDA) was similar in polarized HepG2 cells treated with anti-CLDN1 mAbs OM-7D3-B3, OM-8A9-A3, control mAb,

or phosphate-buffered saline, whereas CMTDA retention was reduced in phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA), tumor necrosis factor (TNF)  $\alpha$ , and interferon- $\gamma$ -treated HepG2 cells (Figure 7E). These data indicate that anti-CLDN1 mAbs do not affect TJ integrity.

### Discussion

Here we demonstrate, for the first time, the successful production of anti-CLDN1 mAbs, which broadly inhibit HCV infection including patient-derived escape variants that are resistant to autologous host neutralizing responses. Because of the absence of preventive strategies for reinfection and limited efficacy and tolerability of interferon-based antiviral therapies in liver transplant recipients, there is a major medical need for the development of novel approaches preventing HCV infection of the liver graft.<sup>4,31</sup> In contrast to chronic hepatitis B, where antiviral antibodies efficiently prevent reinfection

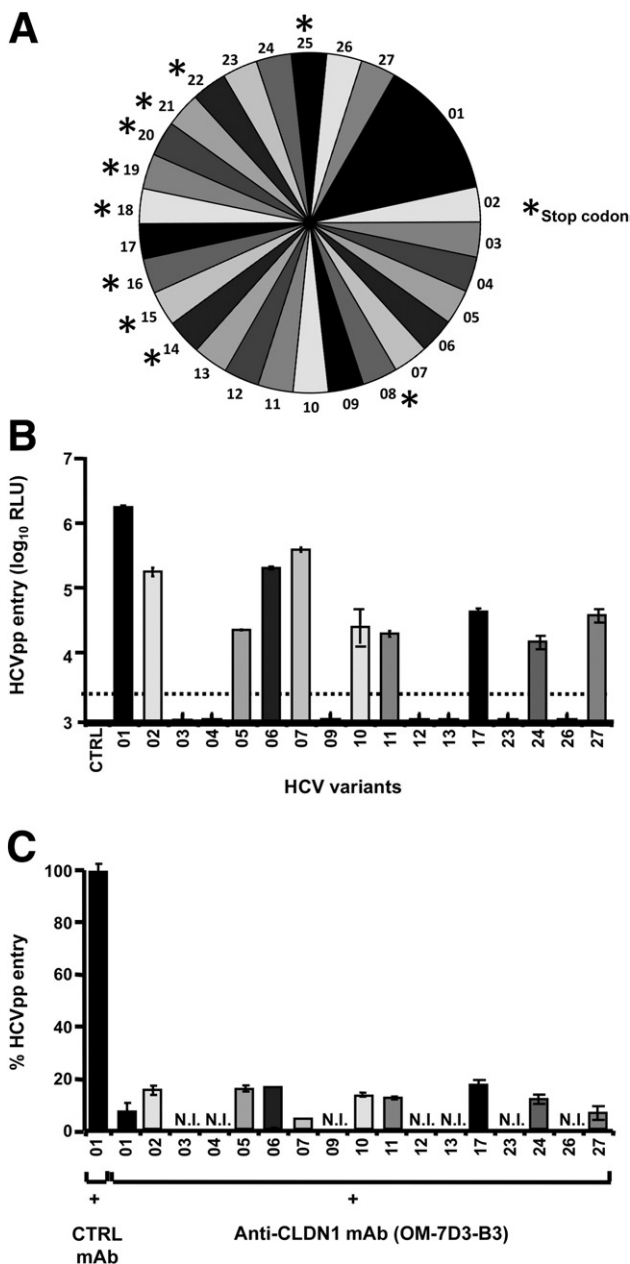


of the liver graft in combination with nucleoside analogues, the development of prophylactic strategies for HCV reinfection remains a challenge.<sup>31</sup> A key limitation for the development of preventive strategies is the high variability of the virus resulting in rapid and constant escape from neutralizing anti-envelope antibodies.<sup>26,32</sup> In a detailed longitudinal analysis of 6 patients undergoing liver transplantation and HCV reinfection, we have previously shown that HCV evades host neutralizing responses because of rapidly emerging adaptive mutations in the HCV envelope glycoproteins.<sup>24</sup> The liver graft is infected by highly infectious HCV escape variants that are resistant to autologous host responses.<sup>24</sup> Escape from neutralizing antibodies has been also described as an important mechanism for viral persistence in chronic

HCV infection.<sup>26</sup> Thus, blocking essential cellular entry factors may be a promising alternative antiviral strategy by increasing the genetic barrier for viral resistance.

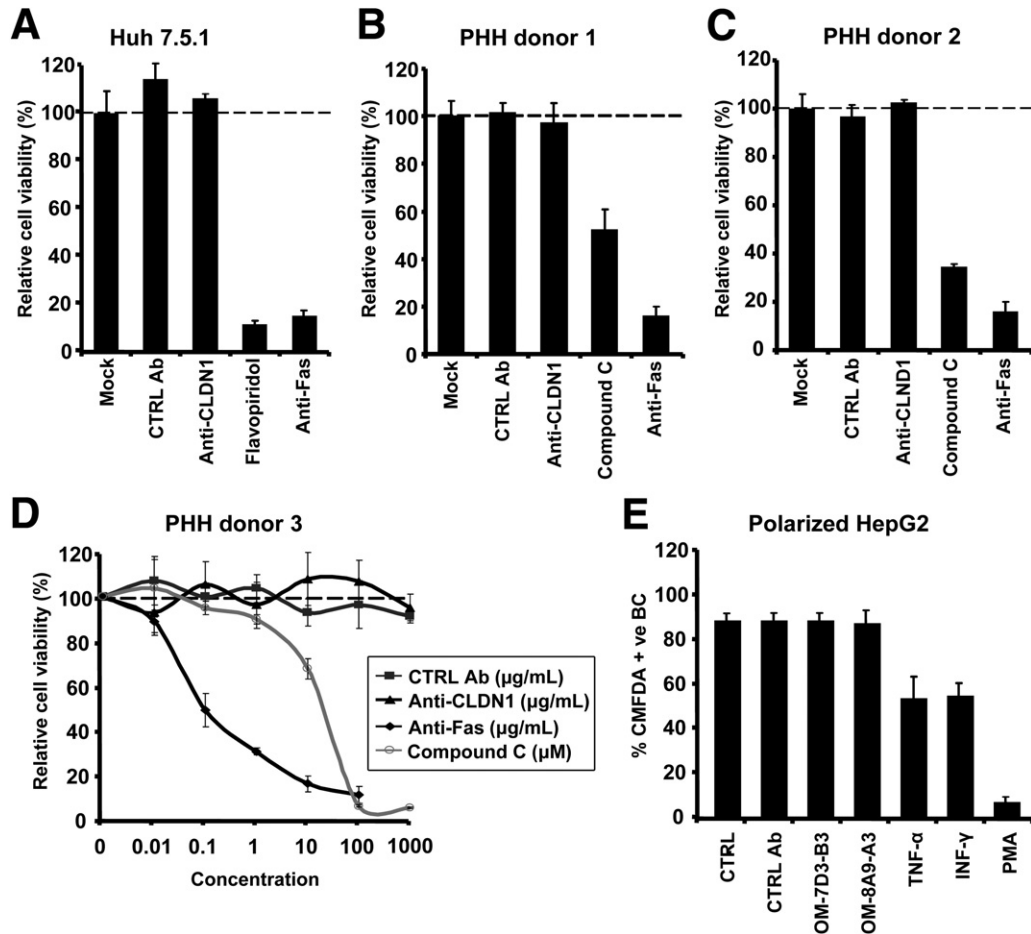
In this study, we demonstrate for the first time that anti-CLDN1 mAbs efficiently inhibit infection of PHH with HCV isolates having escaped host neutralizing antibodies during liver transplantation. The broad neutralization of a large panel of HCV escape variants from 6 patients undergoing liver transplantation (Figure 4) suggests that cross-inhibiting anti-CLDN1 mAbs, with or without concomitant antiviral therapy, may offer a promising strategy to prevent HCV reinfection of the liver graft. Because anti-CLDN1 mAbs inhibit viral infection already by more than 99% (Figure 3), the combination of anti-CLDN1 mAbs with direct antiviral agents such as anti-envelope antibodies (Figure 5) or viral protease inhibitors<sup>3</sup> most likely will completely block HCV infection.

Interestingly, the doses of anti-CLDN1 mAbs required for efficient inhibition (>90%) of escape variants or quasi-species present in chronically infected patients (10–50 µg/mL) were markedly lower than antibody to hepatitis B virus surface antigen (anti-HBs) plasma concentrations required for prevention of hepatitis B virus infection (500 µg/mL antibody to hepatitis B virus surface antigen IgG during the first week post-transplantation and 100 µg/mL after week 12).<sup>33</sup> Inhibitory anti-CLDN1 concentrations were in a similar range as trough levels of plasma concentrations of approved therapeutic or preventive mAbs used in cancer or antiviral treatment.<sup>34,35</sup> Thus, anti-CLDN1 concentrations required for efficient inhibition of HCV infection are in a range of plasma antibody concentrations that can be achieved following intravenous administration of antibodies in vivo.



**Figure 6.** Anti-CLDN1 mAbs broadly inhibit infection of viral quasispecies in chronic HCV infection. Full-length HCV envelope glycoproteins were cloned and sequenced from plasma of an individual patient chronically infected with HCV (genotype 1b) using E1E2-specific primers as described.<sup>9</sup> A total of 30 clones were analyzed by alignment of E1E2 sequences. Lentiviral HCVpp displaying patient-derived envelope were produced as described.<sup>9,18</sup> (A) Relative distribution of the variants in the HCV-infected patient based on alignment of E1E2 sequences. Variants containing stop codons, insertions, or deletions altering the HCV open reading frame are depicted with an asterisk (\*) and were not further analyzed in HCVpp assays. (B) Comparative analysis of viral entry of HCVpp bearing envelope glycoproteins of viral quasispecies in PHH. HIV-HCVpp expressing patient-derived envelope glycoproteins were incubated with PHH, and infection was analyzed as described in Supplementary Figure S1. Results are expressed in relative light units (RLU) plotted in a logarithmic scale. The threshold for a detectable infection in this system was  $3 \times 10^3$  RLU and is indicated by a dotted line. (C) Inhibition of HCV entry by anti-CLDN1 mAbs. PHH were preincubated with rat anti-CLDN1 OM-7D3-B3 or rat isotype control mAbs (25 µg/mL) and infected with HCVpp bearing HCV envelope glycoproteins from quasispecies shown in A. Means  $\pm$  SD from a representative experiment performed in triplicate are shown. Abbreviations: NI, non-infectious; CTRL, negative control.

BASIC-LIVER, PANCREAS, AND BILIARY TRACT



**Figure 7.** Absent toxicity and absent adverse effects on tight junction integrity in PHH and hepatoma cells. (A–D) Cytotoxic effects on cells were assessed by analyzing the ability to metabolize 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT).<sup>27</sup> Huh7.5.1 cells (A) and PHH from 3 different donors (B–D) were incubated either with isotype control or anti-CLDN1 OM-7D3-B3 mAbs (10 µg/mL), anti-Fas (10 µg/mL), flavopiridol (10 µmol/L), or compound C (20 µmol/L) (B and C) or anti-CLDN1 OM-7D3-B3 mAb (0–1000 µg/mL), anti-Fas (0–100 µg/mL), and compound C (0–1000 µmol/L). (D) Relative cell viability was assessed in comparison with mock incubated PHH (=100%). (E) Anti-CLDN1 mAbs do not alter tight junction (TJ) integrity in polarized HepG2 cells. Cells were treated with serum-free medium for 4 hours before being exposed to either control (phosphate-buffered saline), irrelevant control, anti-CLDN1 OM-7D3-B3 and OM-8A9-A3 mAbs (10 µg/mL), tumor necrosis factor (TNF)-α (10 ng/mL), interferon-γ (10 ng/mL), phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) (50 ng/mL) for 1 hour. TJ integrity was analyzed by analyzing the capacity of bile canaliculi<sup>37</sup> to retain 5-chloromethylfluorescein diacetate (CMFDA) compared with the total BC as described.<sup>20</sup> Means ± standard deviations from representative experiments performed in triplicate are shown (A–E).

Moreover, anti-CLDN1 mAbs may also be of interest to target antiviral resistance in chronic hepatitis C. Because anti-CLDN1 mAbs broadly inhibit infection of highly diverse viral quasispecies and escape variants in a genotype-independent manner, it is conceivable that anti-CLDN1 mAbs may complement ongoing efforts to block intracellular replication events with inhibitors of the HCV proteases and polymerase. This concept is supported by the successful clinical use of entry inhibitors for viral resistance in combination with other antivirals in HIV infection.<sup>36</sup>

Using a panel of well-characterized CLDN1 mutants, we demonstrate that mAb OM-7D3-B3 recognizes a cluster of amino acid residues comprising W(30)-GLW(51)-C(54)-C(64) as well as residues of the CLDN1 EL1 N-terminal third. Interestingly, these CLDN1 regions have

been shown to be important for HCV entry in mutagenesis studies.<sup>13,21</sup> Because the identified epitopes are structurally not grouped together, it is likely that recognized epitopes are conformation dependent. This hypothesis is further supported by the finding that (1) anti-CLDN1 mAbs did not show an easily detectable interaction with linear CLDN1 peptides as antigens in an enzyme-linked immunosorbent assay and that (2) preincubation of antibodies with linear peptides encoding for amino acids of the CLDN1 EL1 were not able to revert antibody-mediated inhibition of infection (data not shown). Thus, our results indicate that the targeted epitopes are conformational in nature, rather than linear, confirming that genetic immunization focuses on recognition of native proteins and offers an explanation why this technology has proven successful. Taken together, our results define

epitopes in CLDN1 EL1, which are crucial for HCV entry and are accessible to antibodies blocking HCV infection.

A potential limitation of the clinical use of antireceptor antibodies could be adverse effects. Host cell factors have important functions that may be linked to mechanism of viral entry. Antibodies binding to cellular entry factors may alter the function or expression of receptors resulting in side effects. Interestingly, no toxic effects were detected in PHH based on MTT testing. Furthermore, anti-CLDN1 mAbs had no adverse effect on TJ integrity in polarized hepatoma cells (Figure 7). This finding suggests that TJ CLDN1 is not accessible for anti-CLDN1 mAbs or that CLDN1 domains targeted by anti-CLDN1 mAbs are different from functional domains required for TJ integrity. Although further studies are needed to address toxicity in hepatic and extrahepatic tissues (such as the kidney) *in vivo*, our studies in PHH and hepatoma cells did not reveal any findings precluding the further development of the antibodies.

In conclusion, our findings demonstrate that targeting CLDN1 EL1 by anti-CLDN1 mAbs broadly cross-neutralizes HCV infection and therefore constitutes a novel antiviral approach to prevent primary HCV infection, such as after liver transplantation, and might also restrain virus spread in chronically infected patients. Following humanization of the anti-CLDN1 mAbs, proof-of-concept studies in animal models and humans are the next step for the clinical development.

### Supplementary Material

Note: To access the supplementary material accompanying this article, visit the online version of *Gastroenterology* at [www.gastrojournal.org](http://www.gastrojournal.org), and at doi: [10.1053/j.gastro.2010.05.073](https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.05.073).

### References

- Lauer GM, Walker BD. Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2001;345:41–52.
- Tai AW, Chung RT. Treatment failure in hepatitis C: mechanisms of non-response. *J Hepatol* 2009;50:412–420.
- Hezode C, Forestier N, Dusheiko G, et al. Telaprevir and peginterferon with or without ribavirin for chronic HCV infection. *N Engl J Med* 2009;360:1839–1850.
- Brown RS. Hepatitis C and liver transplantation. *Nature* 2005;436:973–978.
- Pereira AA, Jacobson IM. New and experimental therapies for HCV. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2009;6:403–411.
- Timpe JM, McKeating JA. Hepatitis C virus entry: possible targets for therapy. *Gut* 2008;57:1728–1737.
- Zeisel MB, Cosset FL, Baumert TF. Host neutralizing responses and pathogenesis of hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2008;48:299–307.
- Osburn WO, Fisher BE, Dowd KA, et al. Spontaneous control of primary hepatitis C virus infection and immunity against persistent reinfection. *Gastroenterology* 2009;138:315–324.
- Pestka JM, Zeisel MB, Blaser E, 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.
- Barth H, Schafer C, Adah MI, et al. Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate. *J Biol Chem* 2003;278:41003–41012.
- Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, et al. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 1998;282:938–941.
- Scarselli E, Ansuini H, Cerino R, et al. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J* 2002;21:5017–5025.
- Evans MJ, von Hahn T, Tschernie DM, et al. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* 2007;446:801–805.
- Ploss A, Evans MJ, Gaysinskaya VA, et al. Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature* 2009;457:882–886.
- Haid S, Windisch MP, Bartenschlager R, et al. Mouse-specific residues of claudin-1 limit hepatitis C virus genotype 2a infection in a human hepatocyte cell line. *J Virol* 2010;84:964–975.
- Timpe JM, Stamataki Z, Jennings A, et al. Hepatitis C virus cell-cell transmission in hepatoma cells in the presence of neutralizing antibodies. *Hepatology* 2008;47:17–24.
- Furuse M, Fujita K, Hiragi T, et al. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol* 1998;141:1539–1550.
- Krieger SE, Zeisel MB, Davis C, et al. Inhibition of hepatitis C virus infection by anti-claudin-1 antibodies is mediated by neutralization of E2-CD81-Claudin-1 associations. *Hepatology* 2010;51:1144–1157.
- Zhong J, Gastaminza P, Cheng G, et al. Robust hepatitis C virus infection *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:9294–9299.
- Mee CJ, Harris HJ, Farquhar MJ, et al. Polarization restricts hepatitis C virus entry into HepG2 hepatoma cells. *J Virol* 2009;83:6211–6221.
- Cukierman L, Meertens L, Bertaux C, et al. 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.
- Catanese MT, Graziani R, von Hahn T, et al. High-avidity monoclonal antibodies against the human scavenger class B type I receptor efficiently block hepatitis C virus infection in the presence of high-density lipoprotein. *J Virol* 2007;81:8063–8071.
- Koutsoudakis G, Kaul A, Steinmann E, et al. Characterization of the early steps of hepatitis C virus infection by using luciferase reporter viruses. *J Virol* 2006;80:5308–5320.
- Fafi-Kremer S, Fofana I, Soulier E, et al. Viral entry and escape from antibody-mediated neutralization influence hepatitis C virus re-infection in liver transplantation. *J Exp Med* 2010; in press.
- Haberstroh A, Schnober EK, Zeisel MB, et al. Neutralizing host responses in hepatitis C virus infection target viral entry at post-binding steps and membrane fusion. *Gastroenterology* 2008;135:1719–1728.
- von Hahn T, Yoon JC, Alter H, et al. Hepatitis C virus continuously escapes from neutralizing antibody and T-cell responses during chronic infection *in vivo*. *Gastroenterology* 2007;132:667–678.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55–63.

28. Law M, Maruyama T, Lewis J, et al. Broadly neutralizing antibodies protect against hepatitis C virus quasispecies challenge. *Nat Med* 2008;14:25–27.
29. Vanwolleghem T, Bukh J, Meuleman P, et al. Polyclonal immunoglobulins from a chronic hepatitis C virus patient protect human liver-chimeric mice from infection with a homologous hepatitis C virus strain. *Hepatology* 2008;47:1846–1855.
30. Ray SC, Fanning L, Wang XH, et al. Divergent and convergent evolution after a common-source outbreak of hepatitis C virus. *J Exp Med* 2005;201:1753–1759.
31. Roche B, Samuel D. Liver transplantation in viral hepatitis: prevention of recurrence. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2008;22:1153–1169.
32. Keck ZY, Li SH, Xia J, et al. Mutations in hepatitis C virus E2 located outside the CD81 binding sites lead to escape from broadly neutralizing antibodies but compromise virus infectivity. *J Virol* 2009;83:6149–6160.
33. Samuel D, Bismuth A, Mathieu D, et al. Passive immunoprophylaxis after liver transplantation in HBsAg-positive patients. *Lancet* 1991;337:813–815.
34. Boeckh M, Berrey MM, Bowden RA, et al. Phase 1 evaluation of the respiratory syncytial virus-specific monoclonal antibody palivizumab in recipients of hematopoietic stem cell transplants. *J Infect Dis* 2001;184:350–354.
35. Leyland-Jones B, Gelmon K, Ayoub JP, et al. Pharmacokinetics, safety, and efficacy of trastuzumab administered every three weeks in combination with paclitaxel. *J Clin Oncol* 2003;21:3965–3971.
36. Este JA, Telenti A. HIV entry inhibitors. *Lancet* 2007;370:81–88.
37. Broering TJ, Garrity KA, Boatright NK, et al. Identification and characterization of broadly neutralizing human monoclonal antibodies directed against the E2 envelope glycoprotein of hepatitis C virus. *J Virol* 2009;83:12473–12482.

---

Received January 26, 2010. Accepted May 24, 2010.

#### *Reprint requests*

Address requests for reprints to: Thomas F. Baumert, MD, Inserm Unit 748, Université de Strasbourg, 3 rue Koeberlé, F-67000 Strasbourg, France. e-mail: [Thomas.Baumert@unistra.fr](mailto:Thomas.Baumert@unistra.fr); fax: (33) 3 68 85 37 24.

#### *Acknowledgments*

The authors thank F. V. Chisari (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA) for the gift of Huh7.5.1 cells; R. Bartenschlager (University of Heidelberg, Germany), F.-L. Cosset (Inserm U758, ENS Lyon, France), and J. Ball (University of Nottingham, UK) for providing plasmids for production of HCVcc and HCVpp; KaLy-Cell (Illkirch, France) for providing primary human hepatocytes; M. Parnot and M. Bastien-Valle (all Inserm U748, Strasbourg, France) for excellent technical assistance; J. Dubuisson (Institut Pasteur Lille, France), M. B. Zeisel (Inserm U748, Strasbourg), and C. M. Rice (Rockefeller University, New York) for helpful discussions.

I. F. and S.E.K. contributed equally to this work and are both considered first authors.

#### *Conflicts of interest*

The authors disclose no conflicts. Inserm, the University of Strasbourg and Genovac have filed a patent application on monoclonal anti-Claudin 1 antibodies for the inhibition of hepatitis C virus infection.

#### *Funding*

Supported by Inserm, University of Strasbourg, the chair of excellence program of the Agence Nationale de la Recherche France (ANR-05-CEXC-008), GENOVAC, the Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie (BMW: Pro-INNO II), and by the French Ministry for Research and Education.



## Supplementary Materials and Methods

### *Infection of Primary Human Hepatocytes by Serum-Derived Hepatitis C Virus*

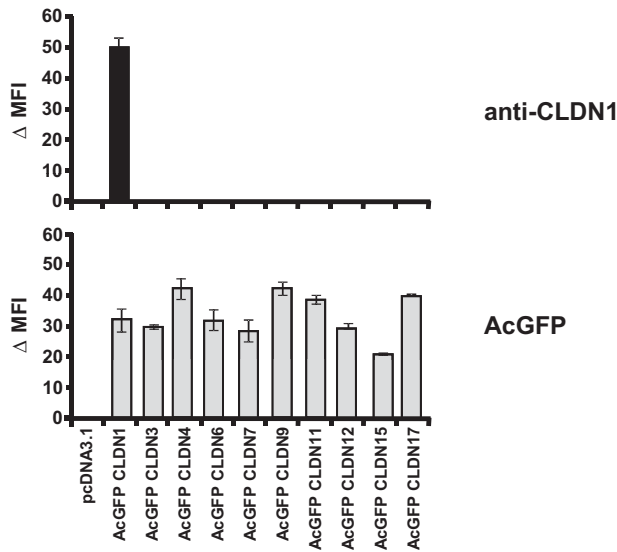
To identify hepatitis C virus (HCV) positive serum samples resulting in productive infection of primary human hepatocytes (PHH), randomly selected serum samples from 18 patients with chronic HCV infection from diverse genotypes were screened for infectivity in PHH. The sera were obtained in the framework of a clinical trial (ClinicalTrials.gov identifier: NCT00638144) and were characterized by a viral load ranging between  $1.27 \times 10^6$  and  $8.8 \times 10^6$  IU/mL (determined by Abbot RealTime HCV, Abbott, Rungis, France) and seronegativity for hepatitis A virus, hepatitis B virus (HBV), and human immunodeficiency virus.

PHH ( $3 \times 10^5$  cells, isolated and cultured in collagen-coated 24 well-plates as described)<sup>1,2</sup> were incubated with 25  $\mu$ L of HCV-positive serum. The cells were then washed 3 times and cultured as described.<sup>3</sup> Five days postinoculation, cells were washed 3 times, and total cellular RNA was extracted using the RNeasy kit (Qiagen). Five hundred nanograms of total RNA were analyzed by quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) using the Sensimix Probe One-Step Kit (BIOLINE, London, UK), using primers corresponding to nucleotides 260–277, 298–313, and 279–296 as described.<sup>4</sup> Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) messenger RNA (mRNA) in each sample was quantified in parallel.<sup>3,5</sup> The measured amounts of HCV RNA were normalized to the amount of GAPDH mRNA in each sample, and the results were expressed per culture plate ( $3 \times 10^5$  cells) as described recently.<sup>3,5</sup> Positive infection was confirmed by de novo detection of intracellular HCV RNA as previously described.<sup>3,5</sup> Using this experimental setup, incubation of PHH with 2 sera resulted in reproducible productive HCV infection. The infectious samples comprised serum No. 08 (45-year-old male patient infected with genotype 2a and a

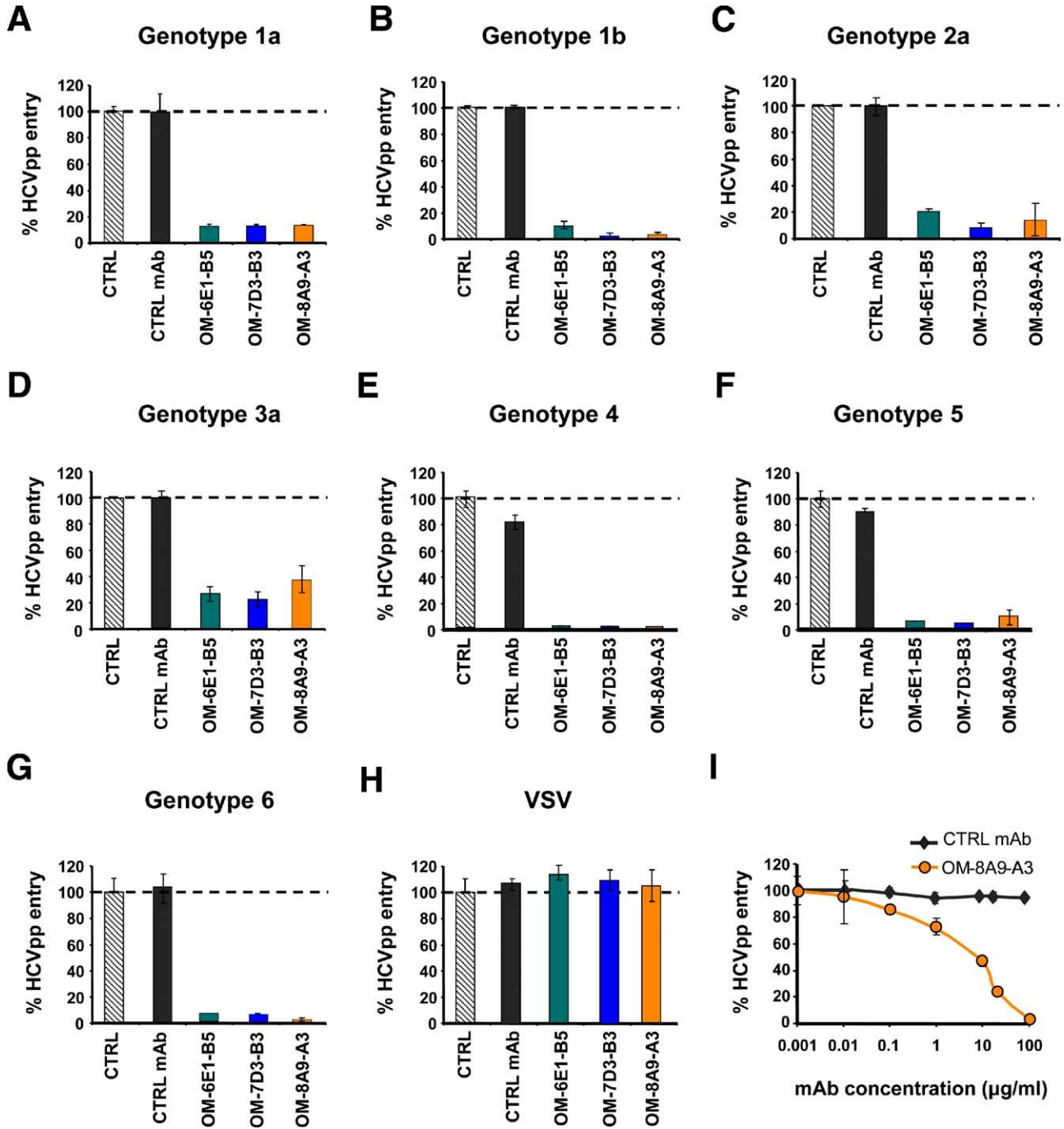
viral load of  $2.51 \times 10^6$  IU/mL) and serum No. 10 (54-year-old female patient infected with HCV genotype 2b and a viral load of  $1.37 \times 10^6$  IU/mL). The infectious serum samples were then used to assess inhibition of HCV infection by anti-claudin (CLDN) 1 monoclonal antibodies (mAbs). One day after plating, PHH were incubated with anti-CLDN1 OM-7D3-B3 or rat isotype control mAbs (25  $\mu$ g/mL) for 1 hour and incubated overnight at 37°C with 25  $\mu$ L of HCV-positive sera No. 08 and No. 10 or HCV negative control serum, respectively. The apparent multiplicity of infection (estimated by the ratio of HCV RNA copies divided by the number of hepatocytes per well) ranged between 0.5 and 1, respectively. Following quantification of intracellular HCV RNA on day 5 postinfection, the HCV RNA levels were normalized to the amount of GAPDH mRNA in each sample as described,<sup>3,5</sup> and the results were expressed as percentage of HCV infection compared with control mAb treated PHH as described.<sup>3,5</sup>

## References

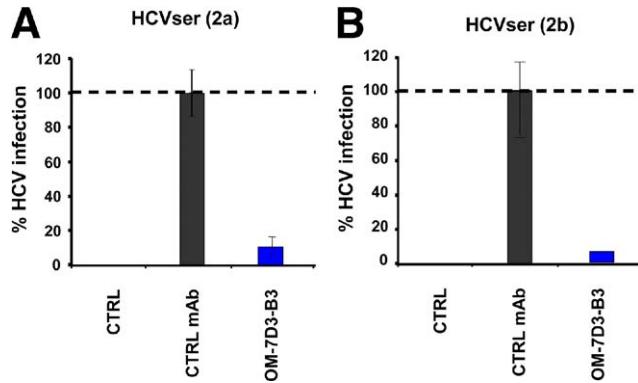
1. Krieger SE, Zeisel MB, Davis C, et al. Inhibition of hepatitis C virus infection by anti-claudin-1 antibodies is mediated by neutralization of E2-CD81-Claudin-1 associations. *Hepatology* 2010;51:1144–1157.
2. Zeisel MB, Koutsoudakis G, Schnober EK, et al. Scavenger receptor class B type I is a key host factor for hepatitis C virus infection required for an entry step closely linked to CD81. *Hepatology* 2007;46:1722–1731.
3. Castet V, Fournier C, Soulier A, et al. Alpha interferon inhibits hepatitis C virus replication in primary human hepatocytes infected in vitro. *J Virol* 2002;76:8189–8199.
4. Engle RE, Russell RS, Purcell RH, et al. Development of a TaqMan assay for the six major genotypes of hepatitis C virus: comparison with commercial assays. *J Med Virol* 2008;80:72–79.
5. Molina S, Castet V, Pichard-Garcia L, et al. Serum-derived hepatitis C virus infection of primary human hepatocytes is tetraspanin CD81 dependent. *J Virol* 2008;82:569–574.
6. Harris HJ, Davis C, Mullins JG, et al. Claudin association with CD81 defines hepatitis C virus entry. *J Biol Chem* 2010;285:21092–21102.



**Supplementary Figure 1.** Absent reactivity of anti-CLDN1 mAbs with nontype 1 members of the human CLDN family. CLDN1-deficient 293T cells were transfected with a panel of *Aequorea coerulea* green fluorescent protein (AcGFP) tagged human CLDNs (1, 3, 4, 6, 7, 9, 11, 12, 15, 17) as described.<sup>1,6</sup> Cells transfected with an unrelated vector (pcDNA3.1) served as a negative control. Binding of anti-CLDN1 mAb OM-7D3-B3 to cell surface CLDN was analyzed as described in Figure 2A. Specific binding of anti-CLDN1 mAb to AcGFP tagged CLDNs is shown as the difference of the mean fluorescence intensity ( $\Delta$ MFI) of cells stained with anti-CLDN1 mAb OM-7D3-B3 and cells stained with isotype control rat mAb (*upper panel*). Proper expression of AcGFP tagged CLDN proteins was confirmed by flow cytometric analysis of AcGFP expression. Specific fluorescence of the respective AcGFP tags is shown as the difference of the mean fluorescence intensity ( $\Delta$ MFI) of cells transfected with each AcGFP tagged expression construct and cells transfected with nontagged CLDN1 (*lower panel*). Means  $\pm$  standard deviation of a representative experiment performed in triplicate are shown.



**Supplementary Figure 2.** Inhibition of HCV pseudoparticles (HCVpp) infection in PHH by anti-CLDN1 mAbs. HIV-based HCVpp bearing envelope glycoproteins of strains (A) H77 (genotype 1a), (B) HCV-J (1b), (C) JFH1 (2a), (D) UKN3A1.28 (3), (E) UKN4.21.16 (4), (F) UKN5.14.4 (5), (G) UKN6.5.340 (6), and (H) VSVpp were produced as described in Materials and Methods section. PHH were preincubated with anti-CLDN1 or isotype control mAbs (25 µg/mL) for 1 hour at 37°C before infection with HCVpp for 4 hours at 37°C. (I) Dose-dependent inhibition of infection by HCVpp bearing envelope glycoproteins of strain H77 using anti-CLDN1 mAb OM-8A9-A3. Experiments were performed as described in Figure 3A. HCVpp infection was assessed as described in Materials and Methods section. Means ± standard deviation from a representative experiment performed in triplicate are shown.



**Supplementary Figure 3.** Anti-CLDN1 mAbs inhibit infection of PHH by serum-derived HCV. PHH were preincubated with anti-CLDN1 OM-7D3-B3 or isotype control mAbs (25  $\mu$ g/mL) for 1 h at 37°C before infection with HCV-positive serum (HCVser) obtained from 2 patients chronically infected with HCV genotypes 2a (A) and 2b (B) or HCV-negative serum (CTRL). Following quantification of newly synthesized intracellular HCV RNA on day 5 postinfection by RT-PCR, HCV RNA levels were normalized to the amount of GAPDH mRNA in each sample as described.<sup>3</sup> The results are expressed as percentage of HCV infection in the presence of anti-CLDN1 antibody compared with infection in the presence of control isotype mAb (=100%). Means  $\pm$  standard deviation from a representative experiment performed in duplicate are shown.

# DISCUSSION

La transplantation hépatique (TH) est le dernier recours thérapeutique des cirrhoses décompensées et des CHC liés au VHC. La réinfection du greffon par le VHC pose un problème majeur dans la gestion des patients infectés par le VHC. Le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques a été longtemps retardé par l'absence d'un système d'étude robuste du VHC *in vitro*. Il est aujourd'hui important de poursuivre les recherches dans ce domaine afin d'améliorer l'arsenal thérapeutique par de nouvelles stratégies antivirales et vaccinales.

## **L'infectiosité du VHC et son échappement aux anticorps neutralisants jouent un rôle déterminant dans la réinfection du greffon hépatique**

Au cours de la TH, le nouveau foie est réinfecté par le VHC dès les premières heures suivant la reperfusion, et seule une fraction des variants viraux du VHC circulant avant la greffe est sélectionnée et persiste après la greffe. Avant la greffe, l'infection par le VHC est chronique et la population virale est soumise à une pression de sélection par l'immunité humorale et cellulaire avec la génération en continue de variants viraux résistants à la réponse immunitaire. Dans ce contexte d'infection chronique, la composition des quasi-espèces virales change progressivement: il y a coexistence entre des variants fortement neutralisés et des variants résistants à la réponse immunitaire. En revanche, la phase précoce suivant la transplantation est caractérisée par une infection *de novo* des hépatocytes sains dans un contexte d'immunosuppression cellulaire importante. Dans notre première étude sur six patients infectés par le VHC et transplantés hépatiques (**publication n°1**), nous avons montré que le changement d'environnement de l'hôte au cours de la transplantation entraîne un changement abrupt de la composition des quasi-espèces du VHC. L'analyse phylogénétique a montré une baisse de la diversité génétique après la greffe avec la sélection d'une fraction de variants relativement homogène chez la majorité des patients. Il semblerait ainsi que l'implantation d'un nouveau foie et le début d'un traitement immunosuppresseur entraîne un effet d'étranglement (« bottleneck effect ») où sont retrouvés uniquement les variants sélectionnés qui sont capables de pénétrer efficacement les hépatocytes du nouveau foie. Par l'analyse fonctionnelle des variants présents

avant et après la greffe et par la construction de VHCpp des variants viraux de chaque patient, nous avons montré que les variants viraux qui réinfectent le nouveau foie contiennent des mutations dans leur génome qui favorisent leur entrée dans les cellules hépatiques. Ces mêmes mutations permettent à ces variants viraux d'échapper aux anticorps neutralisants du patient. Ceci suggère que la capacité d'entrée du VHC dans la cellule et son échappement aux anticorps neutralisants jouent un rôle clé dans la sélection des variants viraux après la greffe. Ce concept a été confirmé par l'infection de souris uPA-SCID (souris transgéniques immunodéficientes transplantées avec des hépatocytes humains) avec le sérum de l'un des patients de la cohorte. Trois semaines après l'infection, nous avons montré que le variant sélectionné chez le patient après la greffe était le même variant prédominant dans le plasma et le foie collectés chez la souris. Nous avons, de plus, montré que des anticorps monoclonaux dirigés contre le virus ou contre le facteur de l'hôte CD81 sont capables d'inhiber efficacement l'infection des cellules hépatiques par les virus résistants aux anticorps neutralisants du patient. Ces résultats suggèrent que l'entrée virale constitue une cible prometteuse pour la prévention de la réinfection du greffon par le VHC.

### **Nécessité d'une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires de l'entrée du VHC dans la cellule hôte et de son échappement aux anticorps neutralisation**

L'entrée du VHC fait intervenir au moins quatre facteurs d'entrée de l'hôte : SR-BI, CD81, CLDN1 et OCLN. Cependant le rôle de ces facteurs dans l'échappement aux anticorps neutralisants n'étant pas encore bien défini, nous avons procédé à l'analyse comparative de deux variants provenant d'un même patient: un variant sélectionné et réinfectant le nouveau foie et un variant non détecté suite à la transplantation (**publication n°2**). Nous avons identifié 2 mutations aux positions 458 et 478 dans la glycoprotéine E2 responsables de l'infectiosité accrue du variant sélectionné lors de la greffe, mais aussi, de manière surprenante de l'échappement aux anticorps neutralisants du patients. La glycoprotéine d'enveloppe E2 contient trois domaines potentiels de liaison à CD81 (domaine I (aa 412 - 424), II (aa 474 - 495) et III (aa 520 - 550)) (Owsianka et al. 2006). Le résidu 458 se trouve juste en aval du premier domaine et le résidu 478 dans le

deuxième domaine. Nous avons montré que ces deux résidus augmentent l'affinité de la glycoprotéine E2 à la large boucle extracellulaire (LEL) de CD81. Ces données suggèrent donc que les mutations acquises aux positions 458 et 478 sont cruciales pour l'interaction E2-CD81-LEL et que la liaison entre le virus et CD81 est un facteur important dans la sélection et dans l'échappement viral de variants viraux lors de la transplantation hépatique. En effet, nous avons démontré que ces 2 mutations permettent l'échappement, au cours d'une étape post-attachement et concomitante à l'interaction entre E2 et CD81, à des anticorps anti-E2 connus pour leur action inhibitrice de l'interaction E2-CD81 (Hadlock et al. 2000; Keck et al. 2004). Ces anticorps sont dirigés contre une région dans la glycoprotéine d'enveloppe E2, nommé domaine B (Keck et al. 2004). Ceci suggère que les positions 458 et 478 de E2 font partie d'un épitope jouant un rôle clé dans la neutralisation et dans l'échappement viral. En résumé, ces mutations (i) modulent la dépendance à CD81, (ii) augmentent l'affinité à la CD81-LEL, (iii) entraînent un échappement viral à une étape post-attachement et concomitante à l'interaction VHC-CD81 et (iv) sont potentiellement localisées au niveau de 2 boucles de la glycoprotéine E2 (Krey et al. 2010). Les mutations acquises par les variants sélectionnés pourraient ainsi changer la conformation de la glycoprotéine E2, modulant l'interaction E2-CD81 et masquant en parallèle les sites de fixation des anticorps neutralisants. Des travaux pour caractériser les changements de conformation éventuels au niveau des glycoprotéines sont en cours.

Parallèlement, la surexpression du facteur de l'hôte SR-BI augmente l'entrée des VHCpp dérivées du variant sélectionné, démontrant aussi le rôle important de ce facteur cellulaire dans l'entrée des variants dérivés de patients (**publication n°2**). Cette dépendance n'était cependant pas due aux deux mutations identifiées. Ces résultats suggèrent que d'autres mutations, notamment dans la région HVRI, sont aussi impliquées dans l'entrée des variants sélectionnées lors de la greffe. Il sera intéressant d'évaluer le rôle de ces mutations et l'interaction avec SR-BI dans l'entrée des variants sélectionnés.

De manière intéressante, le variant sélectionné lors de la greffe échappe partiellement à l'action neutralisante de sérums provenant de patients chroniquement infectés, suggérant que ce mécanisme d'évasion virale pourrait s'appliquer à l'échappement viral en général lors d'une infection chronique. Ces données sont en accord avec des études précédentes montrant que le virus échappe continuellement aux anticorps neutralisants lors de l'infection chronique (von

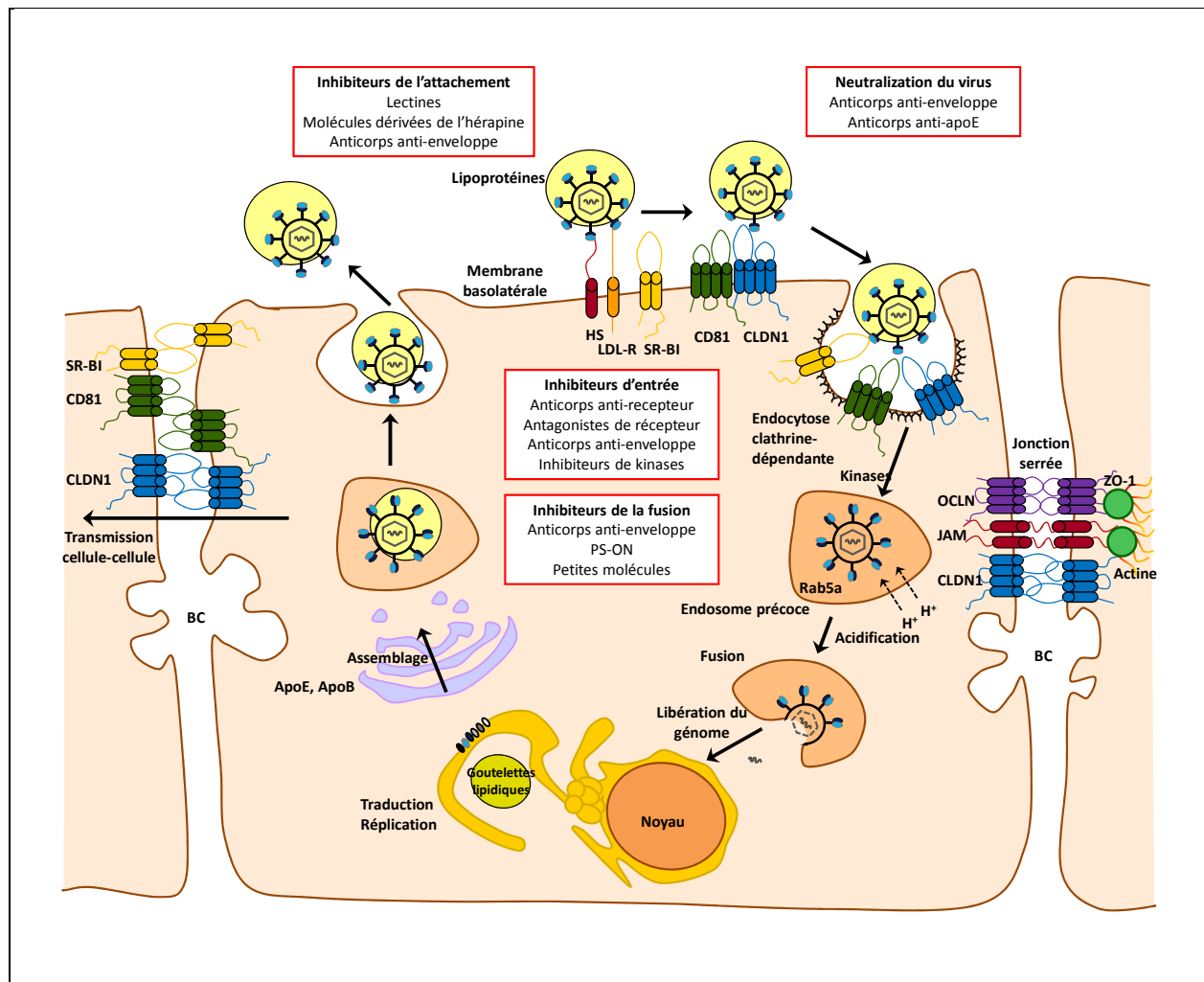
Hahn et al. 2007). Nos données soulignent l'importance de déterminer les mécanismes moléculaires impliqués à la fois dans l'entrée du virus et dans son échappement à la neutralisation, afin de développer des stratégies antivirales adaptées, ainsi que l'importance de cibler les interactions virus-facteurs de l'hôte.

### **L'entrée du VHC est une cible intéressante pour la lutte antivirale**

Le virus et les facteurs de l'hôte représentent ainsi des cibles prometteuses pour le développement de nouveaux traitements thérapeutiques. En effet, il est primordial de mettre en place des thérapies combinées plus efficaces et mieux tolérées par les patients dont la durée de traitement serait plus courte que les traitements actuels. A ce jour, de nombreuses molécules ciblant les protéines non-structurales telles la protéase, la polymérase et la protéine NS5A, ont été développées et sont en cours de développement clinique (Hezode et al. 2009; Pereira et al. 2009; Sarrazin et al. 2010). Les premières données cliniques sont prometteuses, cependant leur utilisation en monothérapie reste limitée due aux problèmes de toxicité et à l'émergence de résistance. Ceci suggère que le développement de composés additionnels, ciblant idéalement différentes étapes du cycle viral, est nécessaire pour la mise en place d'une thérapie anti-VHC efficace. La complexité des mécanismes de l'infection par le VHC offre de nombreuses molécules cibles pour neutraliser/inhiber le virus. De nombreuses molécules sont en cours de développement et/ou leur activité neutralisante/inhibitrice a été prouvée *in vitro* et *vivo* (Figure 10)

Comme nous le montrons, l'entrée du virus dans la cellule est une cible intéressante pour la lutte antivirale préventive et thérapeutique (**publications n°1 et 2**). En effet, l'entrée du virus est essentielle pour l'initiation, la propagation et le maintien de l'infection par le VHC. Cibler l'entrée pourrait permettre aux nouvelles molécules d'interférer au niveau de plusieurs étapes : (i) bloquer l'interaction virus-cellule cible durant la liaison et l'attachement aux facteurs de l'hôte, (ii) interférer avec les étapes post-attachement et (iii) bloquer la fusion virale (Figure 10). Les inhibiteurs d'entrée incluent les anticorps neutralisants ciblant l'enveloppe virale et les anticorps dirigés contre les facteurs de l'hôte, ainsi que les petites molécules ou siARN dirigés contre les facteurs de l'hôte ou les protéines virales (Zeisel et al. 2009).





**Figure 10: Entrée du VHC dans les hépatocytes: cibles des thérapies antivirales.** Les inhibiteurs d'entrée peuvent potentiellement agir à différentes étapes du cycle viral, comme l'attachement, les étapes post-attachement et la fusion.

Les étapes de l'attachement et l'entrée virale sont les cibles des défenses cellulaires de l'hôte et des anticorps neutralisants dirigés contre le VHC. Les anticorps neutralisants sont définis par leur capacité antivirale qui permet de bloquer l'entrée du virus et d'éviter la propagation du virus. Les anticorps neutralisants peuvent agir à différentes étapes du processus d'entrée telles l'attachement, les étapes post-attachement et la fusion (Zeisel et al. 2007). Comme décrit précédemment, étant donné que la clairance virale corrèle avec l'induction d'anticorps neutralisants, les anticorps neutralisants représentent une approche intéressante dans le développement de stratégies préventives et/ou thérapeutiques efficaces. En effet, il a été démontré que l'administration d'immunoglobulines polyclonales provenant d'un patient

chroniquement infecté pouvait conférer une immunité stérilisante *in vivo*, dans le modèle de souris Alb-uPA/SCID (Vanwolleghem et al. 2008). Récemment, des anticorps humains monoclonaux ont été décrits comme neutralisant de manière croisée des quasi-espèces *in vivo* dans le modèle de souris Alb-uPA/SCID (Law et al. 2008). Deux équipes ont, de plus, évalué la capacité d'anticorps anti-VHC à prévenir la réinfection du greffon par le VHC. Des immunoglobulines enrichies en anticorps anti-VHC (CIVACIR) ont été utilisées dans la première étude et des anticorps monoclonaux dirigés contre un épitope de la glycoprotéine E2 du VHC (HCV-Ab<sup>XTL</sup>-68) dans la seconde (Davis et al. 2005; Schiano et al. 2006). Les deux stratégies se sont avérées inefficaces contre l'infection par le VHC. Cet échec est certainement dû à la faible capacité neutralisante de ces anticorps comme l'ont montré les études *in vitro* sur le modèle VHCpp et *in vivo* sur le modèle souris (Eren et al. 2006). Cet échec souligne la nécessité de comprendre les mécanismes d'infection par le VHC. L'avantage de cibler le virus est que cela induirait moins d'effets secondaires au niveau du traitement. Cependant, ce sera un déficit de développer des anticorps neutralisants capables de cibler des épitopes conservés à travers les génotypes, étant donné que le virus s'adapte à son environnement et l'on voit rapidement apparaître des mutants résistants aux anticorps neutralisants (von Hahn et al. 2007; Gal-Tanamy et al. 2008) **(publications n°1 et 2)**

A travers nos travaux, nous montrons que l'interaction entre le virus et les facteurs de l'hôte est un facteur important dans l'échappement aux anticorps neutralisants **(publication n°2)**. Le fait de cibler les facteurs d'entrée de l'hôte, qui sont indispensables pour la dissémination du virus, représente ainsi une autre voie intéressante dans le développement de nouvelles stratégies antivirales. En effet, les facteurs de l'hôte n'étant pas sujets aux mutations, ils offrent une plus forte barrière génétique aux vues des résistances aux traitements.

CD81 est une cible potentielle. En effet, des anticorps anti-CD81 inhibent l'infection par le VHC *in vitro* et *in vivo* dans le modèle de la souris Alb-uPA/SCID (Meuleman et al. 2008). Cette étude montre l'efficacité de cibler CD81 *in vivo* afin d'empêcher l'infection par le VHC et démontre aussi la pertinence clinique de cibler un facteur de l'hôte. De même, nous avons pu montrer que des anticorps monoclonaux anti-CD81 étaient capable d'inhiber de manière dose-dépendante les variants sélectionnés chez les patients transplantés qui étaient résistants aux anticorps neutralisants du patient **(publication n°1)**. Cependant, CD81 est exprimée de manière ubiquitaire

au niveau des cellules. Il sera intéressant de vérifier l'absence de toxicité dans des études d'administration prolongée d'anticorps anti-CD81.

SR-BI se lie à une variété de molécules et représente ainsi aussi une cible intéressante pour le développement d'antiviraux. Des anticorps polyclonaux et monoclonaux inhibent l'infection par les VHCcc *in vitro* (Catanese et al. 2007; Zeisel et al. 2007). Des inhibiteurs de SR-BI ont récemment été développés, tel ITX5061, qui est un composé inhibant l'entrée des VHCpp de différents géotypes et l'infection par les VHCcc (Syder et al. 2010). Ce composé a déjà été évalué chez des patients pour une autre indication clinique et des études cliniques sur des patients infectés par le VHC sont la prochaine étape pour évaluer l'efficacité de ce composé chez l'humain.

Comme nous le montrons dans la **publication n°3**, CLDN1 représente également une cible prometteuse dans la lutte contre le VHC. En effet, CLDN1 est essentielle dans le processus d'entrée du VHC et à ce jour, il n'y a pas de preuve de l'existence d'une voie d'entrée indépendante de CLDN1. Un point négatif pour l'utilisation d'anticorps dirigés contre un facteur de l'hôte serait la toxicité cellulaire. Cependant, à l'inverse d'autres facteurs d'entrée de l'hôte tels que CD81 et SR-BI, la protéine de jonction est exprimée principalement dans le foie, ce qui pourrait éviter des problèmes de toxicité en ciblant cette protéine. Les anticorps polyclonaux anti-CLDN1 montraient déjà une action inhibitrice de l'infection par les VHCcc en l'absence d'effet sur l'intégrité des jonctions serrées *in vitro* (Krieger et al. 2010) et il en est de même pour les anticorps monoclonaux anti-CLDN1 (**publication n°3**). De plus, Dans notre étude, nous montrons que les anticorps monoclonaux anti-CLDN1 inhibent *in vitro* l'entrée des VHCpp de tous les géotypes, des quasi-espèces isolées d'un patient chroniquement infectés et des particules VHC présentes dans le sérum de patient infecté par le VHC (**publication n° 3**). Les anticorps anti-CLDN1 empêchent l'association CD81-CLDN1 qui est essentielle pour l'infection par le VHC (Harris et al. 2010; Krieger et al. 2010). L'action inhibitrice des ces anticorps sur les variants ayant échappé à la réponse immunitaire de l'hôte lors de la réinfection du greffon (**publication n° 1**) montre leur potentiel en tant que stratégie antivirale lors de transplantation hépatique. De plus, l'association d'anticorps anti-CLDN1 et d'anticorps anti-VHC inhibe de manière additive ces variants ayant échappé à la neutralisation de l'hôte, permettant ainsi d'agir à la fois au niveau du virus et au niveau de la cellule hôte. Des études préliminaires effectuées au sein du laboratoire indiquent que les anticorps anti-CLDN1 inhibent également la transmission

cellule à cellule, empêchant ainsi la propagation du virus. L'ensemble de ces résultats suggère que l'utilisation d'anticorps monoclonaux anti-CLDN1, en association avec d'autres molécules antivirales, pourrait être envisagée à la fois dans la prévention de l'infection par le VHC, comme lors de la transplantation hépatique, mais pourrait aussi empêcher la propagation du virus chez les patients présentant une infection chronique par le VHC. La prochaine étape de l'évaluation du potentiel de ces anticorps en tant que nouvelle stratégie antivirale sera de déterminer leur efficacité à inhiber l'infection par le VHC *in vivo* dans le modèle animal Alb-uPA/SCID seul et en association avec d'autres antiviraux.

# CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Au cours de mon travail de thèse, nous avons démontré dans une première partie que l'efficacité de l'entrée des variants du VHC et leur échappement aux anticorps neutralisants jouent un rôle déterminant dans la réinfection par le VHC au cours de la transplantation hépatique. Par l'analyse des séquences de E1E2 et l'utilisation de la mutagenèse dirigée nous avons pu identifier la région 425-483 impliquée dans la différence d'infectiosité et de neutralisation observée entre les variants sélectionnés et ceux non sélectionnés après la greffe. Dans la deuxième partie de ma thèse, nous avons caractérisé les mécanismes moléculaires impliqués dans cette sélection de variants suite à la transplantation. Nous avons identifiés deux résidus dans la région 425-483 de la glycoprotéine E2 responsables de la sélection. Ces deux résidus jouent un rôle primordial dans l'interaction entre le VHC et le facteur cellulaire de l'hôte CD81. Ces résultats permettent d'approfondir la connaissance des mécanismes moléculaires de l'échappement viral lors de l'infection aigüe du greffon hépatique et identifient l'interaction entre le virus et les facteurs de l'hôte, donc l'étape d'entrée, comme facteur clé de la sélection de variants lors de la greffe hépatique. La découverte de ces interactions spécifiques entre le VHC et la cellule hôte lors de la transplantation hépatique est essentielle car elle ouvre de nouvelles perspectives thérapeutiques pour un grand nombre de patients infectés par ce virus. Dans la troisième et dernière partie de ma thèse, nous avons montré que des anticorps dirigés contre le facteur de l'hôte CLDN1, qui est indispensable pour l'infection par le VHC, étaient capables d'inhiber l'infection par ces variants résistants à la neutralisation et réinfectant le greffon. Finalement, dans des études préliminaires, nous avons montré que les anticorps anti-CLDN1 sont capables d'inhiber la transmission cellule à cellule du VHC.

De nombreuses molécules inhibitrices sont en phase clinique. Le facteur limitant l'utilisation de ces molécules est le développement rapide de mutations responsables de la résistance du virus aux traitements. Dans un futur proche et à l'image du traitement actuel de l'infection par le VIH, le traitement optimal anti-VHC sera probablement basé sur la combinaison de plusieurs molécules ciblant différentes étapes du cycle viral. Comme nous l'avons montré, les anticorps anti-CLDN1 et les anticorps anti-E1E2 agissent de manière additive sur l'inhibition de l'entrée des variants résistants à la neutralisation par l'hôte. Ces données montrent ainsi le

potentiel d'utiliser de nouvelles stratégies thérapeutiques combinées dans la lutte contre l'infection par le VHC.

Ainsi, l'ensemble de nos travaux montrent que de nouvelles cibles thérapeutiques pourraient être envisagées non seulement pour prévenir la réinfection du greffon au cours de la transplantation hépatique, mais également pour limiter la dissémination virale au cours de l'hépatite C chronique.

# REFERENCES

## A

- Agnello, V., G. Abel, M. Elfahal, G. B. Knight and Q. X. Zhang (1999). Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 96: 12766-71.
- Akazawa, D., T. Date, K. Morikawa, A. Murayama, M. Miyamoto, M. Kaga, H. Barth, T. F. Baumert, J. Dubuisson and T. Wakita (2007). CD81 expression is important for heterogeneous HCV permissiveness of Huh7 cell clones. *J Virol* 81: 5036-5045.
- Alter, M. J. (2007). Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol* 13: 2436-41.
- Andre, P., F. Komurian-Pradel, S. Deforges, M. Perret, J. L. Berland, M. Sodoyer, S. Pol, C. Brechot, G. Paranhos-Baccala and V. Lotteau (2002). Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles. *J Virol* 76: 6919-28.
- Appel, N. and R. Bartenschlager (2006). A novel function for a micro RNA: negative regulators can do positive for the hepatitis C virus. *Hepatology* 43: 612-5.
- Appel, N., M. Zayas, S. Miller, J. Krijnse-Locker, T. Schaller, P. Friebe, S. Kallis, U. Engel and R. Bartenschlager (2008). Essential role of domain III of nonstructural protein 5A for hepatitis C virus infectious particle assembly. *PLoS Pathog* 4: e1000035.
- Astier-Gin, T., P. Bellecave, S. Litvak and M. Ventura (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: 3872-86.

## B

- Bain, C., P. Parroche, J. P. Lavergne, B. Duverger, C. Vieux, V. Dubois, F. Komurian-Pradel, C. Trepo, L. Gebuhrer, G. Paranhos-Baccala, F. Penin and G. Inchauspe (2004). Memory T-cell-mediated immune responses specific to an alternative core protein in hepatitis C virus infection. *J Virol* 78: 10460-9.
- Bankwitz, D., E. Steinmann, J. Bitzegeio, S. Ciesek, M. Friesland, E. Herrmann, M. B. Zeisel, T. F. Baumert, Z. Y. Keck, S. K. Fong, E. I. Pecheur and T. Pietschmann (2010). Hepatitis C

virus hypervariable region 1 modulates receptor interactions, conceals the CD81 binding site, and protects conserved neutralizing epitopes. *J Virol* 84: 5751-63.

Bartenschlager, R., M. Frese and T. Pietschmann (2004). Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence. *Adv Virus Res* 63: 71-180.

Barth, H., R. Cerino, M. Arcuri, M. Hoffmann, P. Schurmann, M. I. Adah, B. Gissler, X. Zhao, V. Ghisetti, B. Lavezzo, H. E. Blum, F. von Weizsacker, A. Vitelli, E. Scarselli and T. F. Baumert (2005). Scavenger receptor class B type I and hepatitis C virus infection of primary tupaia hepatocytes. *J Virol* 79: 5774-85.

Barth, H., T. J. Liang and T. F. Baumert (2006). Hepatitis C virus entry: molecular biology and clinical implications. *Hepatology* 44: 527-35.

Barth, H., E. Robinet, T. J. Liang and T. F. Baumert (2008). Mouse models for the study of HCV infection and virus-host interactions. *J Hepatol* 49: 134-42.

Barth, H., C. Schäfer, M. I. Adah, F. Zhang, R. J. Linhardt, H. Toyoda, A. Kinoshita-Toyoda, T. Toida, T. H. Van Kuppevelt, E. Depla, F. v. Weizsäcker, H. E. Blum and T. F. Baumert (2003). Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate. *J. Biol. Chem.* 278: 41003-12.

Barth, H., E. K. Schnober, F. Zhang, R. J. Linhardt, E. Depla, B. Boson, F. L. Cosset, A. H. Patel, H. E. Blum and T. F. Baumert (2006). Viral and cellular determinants of the hepatitis C virus envelope-heparan sulfate interaction. *J Virol* 80: 10579-90.

Barth, H., A. Ulsenheimer, G. R. Pape, H. M. Diepolder, M. Hoffmann, C. Neumann-Haefelin, R. Thimme, P. Henneke, R. Klein, G. Paranhos-Baccala, E. Depla, T. J. Liang, H. E. Blum and T. F. Baumert (2005). Uptake and presentation of hepatitis C virus-like particles by human dendritic cells. *Blood* 105: 3605-14. Epub 2005 Jan 18.

Bartosch, B., J. Bukh, J. C. Meunier, C. Granier, R. E. Engle, W. C. Blackwelder, S. U. Emerson, F. L. Cosset and R. H. Purcell (2003). In vitro assay for neutralizing antibody to hepatitis C virus: evidence for broadly conserved neutralization epitopes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 14199-204. .

Bartosch, B., J. Dubuisson and F. L. Cosset (2003). Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J. Exp. Med.* 197: 633-42.

Bartosch, B., G. Verney, M. Dreux, P. Donot, Y. Morice, F. Penin, J. M. Pawlotsky, D. Lavillette and F. L. Cosset (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: 8217-29.

Bartosch, B., A. Vitelli, C. Granier, C. Goujon, J. Dubuisson, S. Pascale, E. Scarselli, R. Cortese, A. Nicosia and F. L. Cosset (2003). 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.

Baumert, T. F., S. Ito, D. T. Wong and T. J. Liang (1998). Hepatitis C virus structural proteins assemble into viruslike particles in insect cells. *J. Virol.* 72: 3827-36.

Baumert, T. F., J. Vergalla, J. Satoi, M. Thomson, M. Lechmann, D. Herion, H. B. Greenberg, S. Ito and T. J. Liang (1999). Hepatitis C virus-like particles synthesized in insect cells as a potential vaccine candidate. *Gastroenterology* 117: 1397-1407.

Benga, W. J., S. E. Krieger, M. Dimitrova, M. B. Zeisel, M. Parnot, J. Lupberger, E. Hildt, G. Luo, J. McLauchlan, T. F. Baumert and C. Schuster (2010). Apolipoprotein E interacts with hepatitis C virus nonstructural protein 5A and determines assembly of infectious particles. *Hepatology* 51: 43-53.

Bertaux, C. and T. Dragic (2006). Different domains of CD81 mediate distinct stages of hepatitis C virus pseudoparticle entry. *J Virol* 80: 4940-8.

Blanchard, E., S. Belouzard, L. Goueslain, T. Wakita, J. Dubuisson, C. Wychowski and Y. Rouille (2006). Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J Virol* 80: 6964-72.

Boulant, S., R. Montserret, R. G. Hope, M. Ratniner, P. Targett-Adams, J. P. Lavergne, F. Penin and J. McLauchlan (2006). Structural determinants that target the hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *J Biol Chem* 281: 22236-47.

Bradley, D. W. (2000). Studies of non-A, non-B hepatitis and characterization of the hepatitis C virus in chimpanzees. *Curr Top Microbiol Immunol* 242: 1-23.

Branch, A. D., D. D. Stump, J. A. Gutierrez, F. Eng and J. L. Walewski (2005). The hepatitis C virus alternate reading frame (ARF) and its family of novel products: the alternate reading frame protein/F-protein, the double-frameshift protein, and others. *Semin Liver Dis* 25: 105-17.

Brown, R. S. (2005). Hepatitis C and liver transplantation. *Nature* 436: 973-8.

- Bukh, J., R. H. Miller and R. H. Purcell (1995). Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. *Semin. Liver. Dis.* 15: 41-63.
- Bukh, J., R. H. Purcell and R. H. Miller (1992). Sequence analysis of the 5' noncoding region of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 4942-6.

## C

- Callens, N., Y. Ciczora, B. Bartosch, N. Vu-Dac, F. L. Cosset, J. M. Pawlotsky, F. Penin and J. Dubuisson (2005). Basic residues in hypervariable region 1 of hepatitis C virus envelope glycoprotein e2 contribute to virus entry. *J Virol* 79: 15331-41.
- Catanese, M. T., H. Ansuini, R. Graziani, T. Huby, M. Moreau, J. K. Ball, G. Paonessa, C. M. Rice, R. Cortese, A. Vitelli and A. Nicosia (2010). Role of scavenger receptor class B type I in hepatitis C virus entry: kinetics and molecular determinants. *J Virol* 84: 34-43.
- Catanese, M. T., R. Graziani, T. von Hahn, M. Moreau, T. Huby, G. Paonessa, C. Santini, A. Luzzago, C. M. Rice, R. Cortese, A. Vitelli and A. Nicosia (2007). High-avidity monoclonal antibodies against the human scavenger class B type I receptor efficiently block hepatitis C virus infection in the presence of high-density lipoprotein. *J Virol* 81: 8063-71.
- Chang, K. S., J. Jiang, Z. Cai and G. Luo (2007). Human apolipoprotein e is required for infectivity and production of hepatitis C virus in cell culture. *J Virol* 81: 13783-93.
- Charlton, M. (2005). Recurrence of hepatitis C infection: Where are we now? *Liver Transpl*: S57-62.
- Chiba, H., M. Osanai, M. Murata, T. Kojima and N. Sawada (2008). Transmembrane proteins of tight junctions. *Biochim Biophys Acta* 1778: 588-600.
- Choo, Q.-L., A. Kuo, A. J. Weiner, L. R. Overby, D. W. Bradley and M. Houghton (1989). Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244: 359-362.
- Cocquerel, L., C. Wychowski, F. Minner, F. Penin and J. Dubuisson (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: 3623-33.

- Codran, A., C. Royer, D. Jaeck, M. Bastien-Valle, T. F. Baumert, M. P. Kieny, C. A. Pereira and J. P. Martin (2006). Entry of hepatitis C virus pseudotypes into primary human hepatocytes by clathrin-dependent endocytosis. *J Gen Virol* 87: 2583-93.
- Coller, K. E., K. L. Berger, N. S. Heaton, J. D. Cooper, R. Yoon and G. Randall (2009). RNA interference and single particle tracking analysis of hepatitis C virus endocytosis. *PLoS Pathog* 5: e1000702.
- Cormier, E. G., R. J. Durso, F. Tsamis, L. Boussemart, C. Manix, W. C. Olson, J. P. Gardner and T. Dragic (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: 14067-72.
- Cormier, E. G., F. Tsamis, F. Kajumo, R. J. Durso, J. P. Gardner and T. Dragic (2004). CD81 is an entry coreceptor for hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 7270-4.
- Cukierman, L., L. Meertens, C. Bertaux, F. Kajumo and T. Dragic (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: 5477-84.

## D

- Davis, G. L., D. R. Nelson, N. Terrault, T. L. Pruett, T. D. Schiano, C. V. Fletcher, C. V. Sapan, L. N. Riser, Y. Li, R. J. Whitley and J. W. Gnann, Jr. (2005). A randomized, open-label study to evaluate the safety and pharmacokinetics of human hepatitis C immune globulin (Civacir) in liver transplant recipients. *Liver Transpl* 11: 941-9.
- Dhillon, S., J. Witteveldt, D. Gatherer, A. M. Owsianka, M. B. Zeisel, M. N. Zahid, M. Rychlowska, S. K. Fong, T. F. Baumert, A. G. Angus and A. H. Patel (2010). Mutations within a conserved region of the hepatitis C virus E2 glycoprotein that influence virus-receptor interactions and sensitivity to neutralizing antibodies. *J Virol* 84: 5494-507.
- Diepolder, H. M., R. Zachoval, R. M. Hoffmann, E. A. Wierenga, T. Santantonio, M. C. Jung, D. Eichenlaub and G. R. Pape (1995). Possible mechanism involving T-lymphocyte response to non-structural protein 3 in viral clearance in acute hepatitis C virus infection. *Lancet* 346: 1006-7.
- Dreux, M., T. Pietschmann, C. Granier, C. Voisset, S. Ricard-Blum, P. E. Mangeot, Z. Keck, S. Fong, N. Vu-Dac, J. Dubuisson, R. Bartenschlager, D. Lavillette and F. L. Cosset (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: 18285-95.

Dubuisson, J., F. Penin and D. Moradpour (2002). Interaction of hepatitis C virus proteins with host cell membranes and lipids. *Trends Cell Biol* 12: 517-23.

## E

Egger, D., B. Wolk, R. Gosert, L. Bianchi, H. E. Blum, D. Moradpour and K. Bienz (2002). Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol* 76: 5974-84.

Eren, R., D. Landstein, D. Terkieltaub, O. Nussbaum, A. Zauberman, J. Ben-Porath, J. Gopher, R. Buchnick, R. Kovjazin, Z. Rosenthal-Galili, S. Aviel, E. Ilan, Y. Shoshany, L. Neville, T. Waisman, O. Ben-Moshe, A. Kischitsky, S. K. Fong, Z. Y. Keck, O. Pappo, A. Eid, O. Jurim, G. Zamir, E. Galun and S. Dagan (2006). Preclinical evaluation of two neutralizing human monoclonal antibodies against hepatitis C virus (HCV): a potential treatment to prevent HCV reinfection in liver transplant patients. *J Virol* 80: 2654-64.

Evans, M. J., C. M. Rice and S. P. Goff (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: 13038-43.

Evans, M. J., T. von Hahn, D. M. Tscherne, A. J. Syder, M. Panis, B. Wolk, T. Hatzioannou, J. A. McKeating, P. D. Bieniasz and C. M. Rice (2007). Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* 446: 801-5.

## F

Falck-Ytter, Y., H. Kale, K. D. Mullen, S. A. Sarbah, L. Sorescu and A. J. McCullough (2002). Surprisingly small effect of antiviral treatment in patients with hepatitis C. *Ann. Intern. Med.* 136: 288-292.

Falkowska, E., F. Kajumo, E. Garcia, J. Reinus and T. Dragic (2007). Hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 glycans modulate entry, CD81 binding, and neutralization. *J Virol* 81: 8072-9.

- Farci, P., H. J. Alter, D. C. Wong, R. H. Miller, S. Govindarajan, R. Engle, M. Shapiro and R. H. Purcell (1994). Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees after antibody-mediated in vitro neutralization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 7792-6.
- Farci, P., A. Shimoda, D. Wong, T. Cabezon, D. De Gioannis, A. Strazzera, Y. Shimizu, M. Shapiro, H. J. Alter and R. H. Purcell (1996). Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees by hyperimmune serum against the hypervariable region 1 of the envelope 2 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 93: 15394-9.
- Feliu, A., E. Gay, M. Garcia-Retortillo, J. C. Saiz and X. Forns (2004). Evolution of hepatitis C virus quasispecies immediately following liver transplantation. *Liver Transpl* 10: 1131-9.
- Feray, C., M. Gigou, D. Samuel, B. Ducot, P. Maisonneuve, M. Reynes, A. Bismuth and H. Bismuth (1998). Incidence of hepatitis C in patients receiving different preparations of hepatitis B immunoglobulins after liver transplantation. *Ann Intern Med* 128: 810-6.
- Flint, M., C. M. Maidens, L. D. Loomis-Price, C. Shotton, J. Dubuisson, P. Monk, A. Hittingbottom, S. Levy and J. McKeating (1999). Characterization of hepatitis C virus E2 glycoprotein interaction with a putative cellular receptor CD81. *J. Virol.* 73: 6235-6244.
- Forns, X., P. J. Payette, X. Ma, W. Satterfield, G. Eder, I. K. Mushahwar, S. Govindarajan, H. L. Davis, S. U. Emerson, R. H. Purcell and J. Bukh (2000). Vaccination of chimpanzees with plasmid DNA encoding the hepatitis C virus (HCV) envelope E2 protein modified the infection after challenge with homologous monoclonal HCV. *Hepatology* 32: 618-25.
- Friebe, P., V. Lohmann, N. Krieger and R. Bartenschlager (2001). Sequences in the 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication. *J Virol* 75: 12047-57.
- Fried, M. W., M. L. Shiffman, K. R. Reddy, C. Smith, G. Marinos, F. L. Goncales, Jr., D. Haussinger, M. Diago, G. Carosi, D. Dhumeaux, A. Craxi, A. Lin, J. Hoffman and J. Yu (2002). Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N. Engl. J. Med.* 347: 975-982.
- Fukumoto, T., T. Berg, Y. Ku, W. O. Bechstein, M. Knoop, H. P. Lemmens, H. Lobeck, U. Hopf and P. Neuhaus (1996). Viral dynamics of hepatitis C early after orthotopic liver transplantation: evidence for rapid turnover of serum virions. *Hepatology* 24: 1351-4.

Furuse, M., K. Fujita, T. Hiiragi, K. Fujimoto and S. Tsukita (1998). Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol* 141: 1539-50.

## G

Gal-Tanamy, M., Z. Y. Keck, M. Yi, J. A. McKeating, A. H. Patel, S. K. Fong and S. M. Lemon (2008). In vitro selection of a neutralization-resistant hepatitis C virus escape mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 19450-5.

Gao, D. Y., X. X. Zhang, G. Hou, G. D. Jin, Q. Deng, X. F. Kong, D. H. Zhang, Y. Ling, D. M. Yu, Q. M. Gong, Q. Zhan, B. L. Yao and Z. M. Lu (2008). Assessment of specific antibodies to F protein in serum samples from Chinese hepatitis C patients treated with interferon plus ribavarin. *J Clin Microbiol* 46: 3746-51.

Garcia-Retortillo, M., X. Forns, A. Feliu, E. Moitinho, J. Costa, M. Navasa, A. Rimola and J. Rodes (2002). Hepatitis C virus kinetics during and immediately after liver transplantation. *Hepatology* 35: 680-7.

Gastaminza, P., G. Cheng, S. Wieland, J. Zhong, W. Liao and F. V. Chisari (2008). Cellular determinants of hepatitis C virus assembly, maturation, degradation, and secretion. *J Virol* 82: 2120-9.

Goffard, A., N. Callens, B. Bartosch, C. Wychowski, F. L. Cosset, C. Montpellier and J. Dubuisson (2005). Role of N-linked glycans in the functions of hepatitis C virus envelope glycoproteins. *J Virol* 79: 8400-9.

Grove, J., S. Nielsen, J. Zhong, M. F. Bassendine, H. E. Drummer, P. Balfe and J. A. McKeating (2008). Identification of a residue in hepatitis C virus E2 glycoprotein that determines scavenger receptor BI and CD81 receptor dependency and sensitivity to neutralizing antibodies. *J Virol* 82: 12020-9.

## H

Haberstroh, A., E. K. Schnober, M. B. Zeisel, P. Carolla, H. Barth, H. E. Blum, F. L. Cosset, G. Koutsoudakis, R. Bartenschlager, A. Union, E. Depla, A. Owsianka, A. H. Patel, C. Schuster, F. Stoll-Keller, M. Doffoel, M. Dreux and T. F. Baumert (2008). Neutralizing

host responses in hepatitis C virus infection target viral entry at postbinding steps and membrane fusion. *Gastroenterology* 135: 1719-1728 e1.

Hadlock, K. G., R. E. Lanford, S. Perkins, J. Rowe, Q. Yang, S. Levy, P. Pileri, S. Abrignani and S. K. Fong (2000). Human monoclonal antibodies that inhibit binding of hepatitis C virus E2 protein to CD81 and recognize conserved conformational epitopes. *J. Virol.* 74: 10407-16.

Harris, H. J., C. Davis, J. G. Mullins, K. Hu, M. Goodall, M. J. Farquhar, C. J. Mee, K. McCaffrey, S. Young, H. Drummer, P. Balfe and J. A. McKeating (2010). Claudin association with CD81 defines hepatitis C virus entry. *J Biol Chem* 285: 21092-102.

Harris, H. J., M. J. Farquhar, C. J. Mee, C. Davis, G. M. Reynolds, A. Jennings, K. Hu, F. Yuan, H. Deng, S. G. Hubscher, J. H. Han, P. Balfe and J. A. McKeating (2008). CD81 and claudin 1 coreceptor association: role in hepatitis C virus entry. *J Virol* 82: 5007-20.

Helle, F., A. Goffard, V. Morel, G. Duverlie, J. McKeating, Z. Y. Keck, S. Fong, F. Penin, J. Dubuisson and C. Voisset (2007). The neutralizing activity of anti-hepatitis C virus antibodies is modulated by specific glycans on the E2 envelope protein. *J Virol* 81: 8101-11.

Helle, F., C. Wychowski, N. Vu-Dac, K. R. Gustafson, C. Voisset and J. Dubuisson (2006). Cyanovirin-N inhibits hepatitis C virus entry by binding to envelope protein glycans. *J Biol Chem* 281: 25177-83.

Hezode, C., N. Forestier, G. Dusheiko, P. Ferenci, S. Pol, T. Goeser, J. P. Bronowicki, M. Bourliere, S. Gharakhanian, L. Bengtsson, L. McNair, S. George, T. Kieffer, A. Kwong, R. S. Kauffman, J. Alam, J. M. Pawlotsky and S. Zeuzem (2009). Telaprevir and peginterferon with or without ribavirin for chronic HCV infection. *N Engl J Med* 360: 1839-50.

Hoofnagle, J. H. and A. M. Di Bisceglie (1997). The treatment of chronic viral hepatitis. *N. Engl. J. Med.* 336: 347-356.

Hsu, M., J. Zhang, M. Flint, C. Logvinoff, C. Cheng-Mayer, C. M. Rice and J. A. McKeating (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., F. Sun, D. M. Owen, W. Li, Y. Chen, M. Gale, Jr. and J. Ye (2007). Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 5848-53.

- Hughes, M. G., Jr., C. K. Rudy, T. W. Chong, R. L. Smith, H. L. Evans, J. C. Iezzoni, R. G. Sawyer and T. L. Pruett (2004). E2 quasispecies specificity of hepatitis C virus association with allografts immediately after liver transplantation. *Liver Transpl* 10: 208-16.
- Hugle, T., F. Fehrmann, E. Bieck, M. Kohara, H. G. Krausslich, C. M. Rice, H. E. Blum and D. Moradpour (2001). The hepatitis C virus nonstructural protein 4B is an integral endoplasmic reticulum membrane protein. *Virology* 284: 70-81.

## I-J

- Jones, C. T., C. L. Murray, D. K. Eastman, J. Tassello and C. M. Rice (2007). Hepatitis C virus p7 and NS2 proteins are essential for production of infectious virus. *J Virol* 81: 8374-83.
- Jopling, C. L., M. Yi, A. M. Lancaster, S. M. Lemon and P. Sarnow (2005). Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science* 309: 1577-81.

## K

- Kaito, M., S. Watanabe, K. Tsukiyama-Kohara, K. Yamaguchi, Y. Kobayashi, M. Konishi, M. Yokoi, S. Ishida, S. Suzuki and M. Kohara (1994). Hepatitis C virus particle detected by immunoelectron microscopic study. *J. Gen. Virol.* 75: 1755-1760.
- Keck, Z. Y., A. Op De Beeck, K. G. Hadlock, J. Xia, T. K. Li, J. Dubuisson and S. K. Fong (2004). Hepatitis C virus E2 has three immunogenic domains containing conformational epitopes with distinct properties and biological functions. *J Virol* 78: 9224-32.
- Kobayashi, M., M. C. Bennett, T. Bercot and I. R. Singh (2006). Functional analysis of hepatitis C virus envelope proteins, using a cell-cell fusion assay. *J Virol* 80: 1817-25.
- Koppel, E. A., K. P. van Gisbergen, T. B. Geijtenbeek and Y. van Kooyk (2005). Distinct functions of DC-SIGN and its homologues L-SIGN (DC-SIGNR) and mSIGNR1 in pathogen recognition and immune regulation. *Cell Microbiol* 7: 157-65.
- Koutsoudakis, G., E. Herrmann, S. Kallis, R. Bartenschlager and T. Pietschmann (2006). The level of CD81 cell surface expression is a key determinant for productive entry of Hepatitis C Virus into host cells. *J Virol* 81: 588-598.
- Koutsoudakis, G., A. Kaul, E. Steinmann, S. Kallis, V. Lohmann, T. Pietschmann and R. Bartenschlager (2006). Characterization of the early steps of hepatitis C virus infection by using luciferase reporter viruses. *J Virol* 80: 5308-20.



- Krey, T., J. d'Alayer, C. M. Kikuti, A. Saulnier, L. Damier-Piolle, I. Petitpas, D. X. Johansson, R. G. Tawar, B. Baron, B. Robert, P. England, M. A. Persson, A. Martin and F. A. Rey (2010). The disulfide bonds in glycoprotein E2 of hepatitis C virus reveal the tertiary organization of the molecule. *PLoS Pathog* 6: e1000762.
- Krieger, M. (2001). Scavenger receptor class B type I is a multiligand HDL receptor that influences diverse physiologic systems. *J. Clin. Invest.* 108: 793-7.
- Krieger, S. E., M. B. Zeisel, C. Davis, C. Thumann, H. J. Harris, E. K. Schnober, C. Mee, E. Soulier, C. Royer, M. Lambotin, F. Grunert, V. L. Dao Thi, M. Dreux, F. L. Cosset, J. A. McKeating, C. Schuster and T. F. Baumert (2010). Inhibition of hepatitis C virus infection by anti-claudin-1 antibodies is mediated by neutralization of E2-CD81-claudin-1 associations. *Hepatology* 51: 1144-57.

## L

- Lai, W. K., P. J. Sun, J. Zhang, A. Jennings, P. F. Lalor, S. Hubscher, J. A. McKeating and D. H. Adams (2006). Expression of DC-SIGN and DC-SIGNR on human sinusoidal endothelium: a role for capturing hepatitis C virus particles. *Am J Pathol* 169: 200-8.
- Lanford, R. E., E. S. Hildebrandt-Eriksen, A. Petri, R. Persson, M. Lindow, M. E. Munk, S. Kauppinen and H. Orum (2010). Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science* 327: 198-201.
- Lauer, G. M. and B. D. Walker (2001). Hepatitis C virus infection. *N. Engl. J. Med.* 345: 41-52.
- Lavie, M., A. Goffard and J. Dubuisson (2007). Assembly of a functional HCV glycoprotein heterodimer. *Curr Issues Mol Biol* 9: 71-86.
- Lavillette, D., B. Bartosch, D. Nourrisson, G. Verney, F. L. Cosset, F. Penin and E. I. Pecheur (2006). Hepatitis C virus glycoproteins mediate low pH-dependent membrane fusion with liposomes. *J Biol Chem* 281: 3909-17.
- Lavillette, D., Y. Morice, G. Germanidis, P. Donot, A. Soulier, E. Pagkalos, G. Sakellariou, L. Intrator, B. Bartosch, J. M. Pawlotsky and F. L. Cosset (2005). Human serum facilitates hepatitis C virus infection, and neutralizing responses inversely correlate with viral replication kinetics at the acute phase of hepatitis C virus infection. *J Virol* 79: 6023-34.
- Lavillette, D., E. I. Pecheur, P. Donot, J. Fresquet, J. Molle, R. Corbau, M. Dreux, F. Penin and F. L. Cosset (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: 8752-65.
- Law, M., T. Maruyama, J. Lewis, E. Giang, A. W. Tarr, Z. Stamatakis, P. Gastaminza, F. V. Chisari, I. M. Jones, R. I. Fox, J. K. Ball, J. A. McKeating, N. M. Kneteman and D. R. Burton (2008). Broadly neutralizing antibodies protect against hepatitis C virus quasispecies challenge. *Nat Med* 14: 25-7.
- Levy, S., S. C. Todd and H. T. Maecker (1998). CD81 (TAPA-1): a molecule involved in signal transduction and cell adhesion in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 16: 89-109.
- Lindenbach, B. D., M. J. Evans, A. J. Syder, B. Wolk, T. L. Tellinghuisen, C. C. Liu, T. Maruyama, R. O. Hynes, D. R. Burton, J. A. McKeating and C. M. Rice (2005). Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 309: 623-6.
- Lindenbach, B. D. and C. M. Rice (2001). Flaviviridae: the viruses and their replication. Fields Virology. D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin et al. Baltimore, Lippincott Williams & Wilkins. 1: 991-1041.
- Liu, S., W. Yang, L. Shen, J. R. Turner, C. B. Coyne and T. Wang (2009). Tight junction proteins claudin-1 and occludin control hepatitis C virus entry and are downregulated during infection to prevent superinfection. *J Virol* 83: 2011-4.
- Logvinoff, C., M. E. Major, D. Oldach, S. Heyward, A. Talal, P. Balfe, S. M. Feinstone, H. Alter, C. M. Rice and J. A. McKeating (2004). Neutralizing antibody response during acute and chronic hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 10149-54. Epub 2004 Jun 25.
- Lohmann, V., F. Korner, A. Dobierzewska and R. Bartenschlager (2001). Mutations in Hepatitis C Virus RNAs Conferring Cell Culture Adaptation. *J Virol* 75: 1437-1449.
- Lohmann, V., F. Körner, J. O. Koch, U. Herian, L. Theilmann and R. Bartenschlager (1999). Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 285: 110-113.
- Lozach, P. Y., A. Amara, B. Bartosch, J. L. Virelizier, F. Arenzana-Seisdedos, F. L. Cosset and R. Altmeyer (2004). C-type lectins L-SIGN and DC-SIGN capture and transmit infectious hepatitis C virus pseudotype particles. *J Biol Chem* 279: 32035-45.

Luik, P., C. Chew, J. Aittoniemi, J. Chang, P. Wentworth, Jr., R. A. Dwek, P. C. Biggin, C. Venien-Bryan and N. Zitzmann (2009). The 3-dimensional structure of a hepatitis C virus p7 ion channel by electron microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 12712-6.

## M

Ma, Y., J. Yates, Y. Liang, S. M. Lemon and M. Yi (2008). NS3 helicase domains involved in infectious intracellular hepatitis C virus particle assembly. *J Virol* 82: 7624-39.

Maillard, P., T. Huby, U. Andreo, M. Moreau, J. Chapman and A. Budkowska (2006). The interaction of natural hepatitis C virus with human scavenger receptor SR-BI/Cla1 is mediated by ApoB-containing lipoproteins. *Faseb J* 20: 735-7.

Marsh, M. and A. Helenius (2006). Virus entry: open sesame. *Cell* 124: 729-40.

McKeating, J. A., L. Q. Zhang, C. Logvinoff, M. Flint, J. Zhang, J. Yu, D. Butera, D. D. Ho, L. B. Dustin, C. M. Rice and P. Balfe (2004). Diverse hepatitis C virus glycoproteins mediate viral infection in a CD81-dependent manner. *J Virol* 78: 8496-505.

McLauchlan, J., M. K. Lemberg, G. Hope, B. Martoglio, G. Barba and F. Harper (2002). Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *EMBO J* 21: 3980-8.

Mee, C. J., H. J. Harris, M. J. Farquhar, G. Wilson, G. Reynolds, C. Davis, I. S. C. van, P. Balfe and J. A. McKeating (2009). Polarization restricts hepatitis C virus entry into HepG2 hepatoma cells. *J Virol* 83: 6211-21.

Meertens, L., C. Bertaux, L. Cukierman, E. Cormier, D. Lavillette, F. L. Cosset and T. Dragic (2008). The tight junction proteins claudin-1, -6, and -9 are entry cofactors for hepatitis C virus. *J Virol* 82: 3555-60.

Meertens, L., C. Bertaux and T. Dragic (2006). Hepatitis C virus entry requires a critical postinternalization step and delivery to early endosomes via clathrin-coated vesicles. *J Virol* 80: 11571-8.

Mercer, D. F., D. E. Schiller, J. F. Elliott, D. N. Douglas, C. Hao, A. Rinfret, W. R. Addison, K. P. Fischer, T. A. Churchill, J. R. Lakey, D. L. Tyrrell and N. M. Kneteman (2001). Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat. Med.* 7: 927-33.

- Meuleman, P., J. Hesselgesser, M. Paulson, T. Vanwolleghem, I. Desombere, H. Reiser and G. Leroux-Roels (2008). Anti-CD81 antibodies can prevent a hepatitis C virus infection in vivo. *Hepatology* 48: 1761-8.
- Meunier, J. C., R. E. Engle, K. Faulk, M. Zhao, B. Bartosch, H. Alter, S. U. Emerson, F. L. Cosset, R. H. Purcell and J. Bukh (2005). Evidence for cross-genotype neutralization of hepatitis C virus pseudo-particles and enhancement of infectivity by apolipoprotein C1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 4560-5. .
- Michalak, J. P., C. Wychowski, A. Choukhi, J. C. Meunier, S. Ung, C. M. Rice and J. Dubuisson (1997). Characterization of truncated forms of hepatitis C virus glycoproteins. *J Gen Virol* 78 ( Pt 9): 2299-306.
- Miyanari, Y., K. Atsuzawa, N. Usuda, K. Watashi, T. Hishiki, M. Zayas, R. Bartenschlager, T. Wakita, M. Hijikata and K. Shimotohno (2007). The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol* 9: 1089-97.
- Molina, S., V. Castet, C. Fournier-Wirth, L. Pichard-Garcia, R. Avner, D. Harats, J. Roitelman, R. Barbaras, P. Graber, P. Ghersa, M. Smolarsky, A. Funaro, F. Malavasi, D. Larrey, J. Coste, J. M. Fabre, A. Sa-Cunha and P. Maurel (2007). The low-density lipoprotein receptor plays a role in the infection of primary human hepatocytes by hepatitis C virus. *J Hepatol* 46: 411-9.
- Moradpour, D., V. Brass, E. Bieck, P. Friebe, R. Gosert, H. E. Blum, R. Bartenschlager, F. Penin and V. Lohmann (2004). Membrane association of the RNA-dependent RNA polymerase is essential for hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* 78: 13278-84.
- Moradpour, D., F. Penin and C. M. Rice (2007). Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Microbiol* 5: 453-63.

## N

- Neumann, A. U., N. P. Lam, H. Dahari, D. R. Gretch, T. E. Wiley, T. J. Layden and A. S. Perelson (1998). Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science* 282: 103-7.

## O

- Ogata, N., H. J. Alter, R. H. Miller and R. H. Purcell (1991). Nucleotide sequence and mutation rate of the H strain of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 3392-6.
- Op De Beeck, A., R. Montserret, S. Duvet, L. Cocquerel, R. Cacan, B. Barberot, M. Le Maire, F. Penin and J. Dubuisson (2000). The transmembrane domains of hepatitis C virus envelope glycoproteins E1 and E2 play a major role in heterodimerization. *J. Biol. Chem.* 275: 31428-37.
- Owsianka, A., R. F. Clayton, L. D. Loomis-Price, J. A. McKeating and A. H. Patel (2001). Functional analysis of hepatitis C virus E2 glycoproteins and virus-like particles reveals structural dissimilarities between different forms of E2. *J. Gen. Virol.* 82: 1877-83.
- Owsianka, A. M., J. M. Timms, A. W. Tarr, R. J. Brown, T. P. Hickling, A. Szwejk, K. Bienkowska-Szewczyk, B. J. Thomson, A. H. Patel and J. K. Ball (2006). Identification of conserved residues in the E2 envelope glycoprotein of the hepatitis C virus that are critical for CD81 binding. *J Virol* 80: 8695-704.

## P

- Patel, A. H., J. Wood, F. Penin, J. Dubuisson and J. A. McKeating (2000). Construction and characterization of chimeric hepatitis C virus E2 glycoproteins: analysis of regions critical for glycoprotein aggregation and CD81 binding. *J Gen Virol* 81: 2873-83.
- Penin, F., V. Brass, N. Appel, S. Ramboarina, R. Montserret, D. Ficheux, H. E. Blum, R. Bartenschlager and D. Moradpour (2004). Structure and function of the membrane anchor domain of hepatitis C virus nonstructural protein 5A. *J Biol Chem* 279: 40835-43.
- Penin, F., C. Combet, G. Germanidis, P. O. Fraïnais, G. Deleage and J. M. Pawlotsky (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: 5703-10.
- Penin, F., J. Dubuisson, F. A. Rey, D. Moradpour and J. M. Pawlotsky (2004). Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology* 39: 5-19.
- Pereira, A. A. and I. M. Jacobson (2009). New and experimental therapies for HCV. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 6: 403-11.
- Pestka, J. M., M. B. Zeisel, E. Blaser, P. Schurmann, B. Bartosch, F. L. Cosset, A. H. Patel, H. Meisel, J. Baumert, S. Viazov, K. Rispeter, H. E. Blum, M. Roggendorf and T. F. Baumert

- (2007). Rapid induction of virus-neutralizing antibodies and viral clearance in a single-source outbreak of hepatitis C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 6025-30.
- Pietschmann, T., A. Kaul, G. Koutsoudakis, A. Shavinskaya, S. Kallis, E. Steinmann, K. Abid, F. Negro, M. Dreux, F. L. Cosset and R. Bartenschlager (2006). Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 7408-13.
- Pietschmann, T., V. Lohmann, A. Kaul, N. Krieger, G. Rinck, G. Rutter, D. Strand and R. Bartenschlager (2002). Persistent and transient replication of full-length hepatitis C virus genomes in cell culture. *J. Virol.* 76: 4008-21.
- Pileri, P., Y. Uematsu, S. Campagnoli, G. Galli, F. Falugi, R. Petracca, A. J. Weiner, M. Houghton, D. Rosa, G. Grandi and S. Abrignani (1998). Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 282: 938-41.
- Ploss, A., M. J. Evans, V. A. Gaysinskaya, M. Panis, H. You, Y. P. de Jong and C. M. Rice (2009). Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature* 457: 882-6.
- Pohlmann, S., J. Zhang, F. Baribaud, Z. Chen, G. J. Leslie, G. Lin, A. Granelli-Piperno, R. W. Doms, C. M. Rice and J. A. McKeating (2003). Hepatitis C Virus Glycoproteins Interact with DC-SIGN and DC-SIGNR. *J. Virol.* 77: 4070-4080.
- Powers, K. A., R. M. Ribeiro, K. Patel, S. Pianko, L. Nyberg, P. Pockros, A. J. Conrad, J. McHutchison and A. S. Perelson (2006). Kinetics of hepatitis C virus reinfection after liver transplantation. *Liver Transpl* 12: 207-16.

## Q-R

- Reynolds, G. M., H. J. Harris, A. Jennings, K. Hu, J. Grove, P. F. Lalor, D. H. Adams, P. Balfe, S. G. Hubscher and J. A. McKeating (2008). Hepatitis C virus receptor expression in normal and diseased liver tissue. *Hepatology* 47: 418-27.
- Roccasecca, R., H. Ansuini, A. Vitelli, A. Meola, E. Scarselli, S. Acali, M. Pezzanera, B. B. Ercole, J. McKeating, A. Yagnik, A. Lahm, A. Tramontano, R. Cortese and A. Nicosia (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: 1856-67.

- Rong, L., H. Dahari, R. M. Ribeiro and A. S. Perelson (2010). Rapid emergence of protease inhibitor resistance in hepatitis C virus. *Sci Transl Med* 2: 30ra32.
- Russo, M. W. and M. W. Fried (2003). Side effects of therapy for chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 124: 1711-9.

## S

- Sakai, A., M. S. Claire, K. Faulk, S. Govindarajan, S. U. Emerson, R. H. Purcell and J. Bukh (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: 11646-51.
- Sarrazin, C. and S. Zeuzem (2010). Resistance to direct antiviral agents in patients with hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 138: 447-62.
- Scarselli, E., H. Ansuini, R. Cerino, R. M. Roccasecca, S. Acali, G. Filocamo, C. Traboni, A. Nicosia, R. Cortese and A. Vitelli (2002). The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J* 21: 5017-5025.
- Schaller, T., N. Appel, G. Koutsoudakis, S. Kallis, V. Lohmann, T. Pietschmann and R. Bartenschlager (2007). Analysis of hepatitis C virus superinfection exclusion by using novel fluorochrome gene-tagged viral genomes. *J Virol* 81: 4591-603.
- Schiano, T. D., M. Charlton, Z. Younossi, E. Galun, T. Pruett, R. Tur-Kaspa, R. Eren, S. Dagan, N. Graham, P. V. Williams and J. Andrews (2006). Monoclonal antibody HCV-AbXTL68 in patients undergoing liver transplantation for HCV: results of a phase 2 randomized study. *Liver Transpl* 12: 1381-9.
- Schvoerer, E., E. Soulier, C. Royer, A. C. Renaudin, C. Thumann, S. Fafi-Kremer, N. Brignon, S. Doridot, N. Meyer, P. Pinson, B. Ellero, M. L. Woehl-Jaegle, C. Meyer, P. Wolf, P. Zachary, T. Baumert and F. Stoll-Keller (2007). Early evolution of hepatitis C virus (HCV) quasispecies after liver transplant for HCV-related disease. *J Infect Dis* 196: 528-36.
- Schwarz, A. K., J. Grove, K. Hu, C. J. Mee, P. Balfe and J. A. McKeating (2009). Hepatoma cell density promotes claudin-1 and scavenger receptor BI expression and hepatitis C virus internalization. *J Virol* 83: 12407-14.

- Shimizu, Y. K., S. M. Feinstone, M. Kohara, R. Purcell and H. Yoshikura (1996). Hepatitis C virus: detection of intracellular virus particles by electron microscopy. *Hepatology* 23: 205-209.
- Simmonds, P., A. Alberti, H. J. Alter, F. Bonino, D. W. Bradley, C. Brechot, J. T. Brouwer, S. W. Chan, K. Chayama, D. S. Chen and et al. (1994). A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes [letter]. *Hepatology* 19: 1321-4.
- Simmonds, P., J. Bukh, C. Combet, G. Deleage, N. Enomoto, S. Feinstone, P. Halfon, G. Inchauspe, C. Kuiken, G. Maertens, M. Mizokami, D. G. Murphy, H. Okamoto, J. M. Pawlotsky, F. Penin, E. Sablon, I. T. Shin, L. J. Stuyver, H. J. Thiel, S. Viazov, A. J. Weiner and A. Widell (2005). Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 42: 962-73.
- Sollner, T. H. (2004). Intracellular and viral membrane fusion: a uniting mechanism. *Curr Opin Cell Biol* 16: 429-35.
- Steinmann, D., H. Barth, B. Gissler, P. Schürmann, M. I. Adah, J. T. Gerlach, G. R. Pape, E. Depla, D. Jacobs, G. Maertens, A. H. Patel, G. Inchauspé, T. J. Liang, H. E. Blum and T. F. Baumert (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., F. Penin, S. Kallis, A. H. Patel, R. Bartenschlager and T. Pietschmann (2007). Hepatitis C Virus p7 Protein Is Crucial for Assembly and Release of Infectious Virions. *PLoS Pathog* 3: e103.
- Sy, T. and M. M. Jamal (2006). Epidemiology of hepatitis C virus (HCV) infection. *Int J Med Sci* 3: 41-6.
- Syder, A. J., H. Lee, M. B. Zeisel, J. Grove, E. Soulier, J. Macdonald, S. Chow, J. Chang, T. F. Baumert, J. A. McKeating, J. McKelvy and F. Wong-Staal (2010). Small molecule scavenger receptor BI antagonists are potent HCV entry inhibitors. *J Hepatol*.

## T

- Tai, A. W. and R. T. Chung (2009). Treatment failure in hepatitis C: mechanisms of non-response. *J Hepatol* 50: 412-20.
- Tai, C. L., W. K. Chi, D. S. Chen and L. H. Hwang (1996). The helicase activity associated with hepatitis C virus nonstructural protein 3 (NS3). *J Virol* 70: 8477-84.



- Thimme, R., D. Oldach, K. M. Chang, C. Steiger, S. C. Ray and F. V. Chisari (2001). Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *J. Exp. Med.* 194: 1395-406.
- Timpe, J. M., Z. Stamataki, A. Jennings, K. Hu, M. J. Farquhar, H. J. Harris, A. Schwarz, I. Desombere, G. L. Roels, P. Balfe and J. A. McKeating (2008). Hepatitis C virus cell-cell transmission in hepatoma cells in the presence of neutralizing antibodies. *Hepatology* 47: 17-24.
- Triyatni, M., B. Saunier, P. Maruvada, A. R. Davis, L. Ulianich, T. Heller, A. Patel, L. D. Kohn and T. J. Liang (2002). Interaction of hepatitis C virus-like particles and cells: a model system for studying viral binding and entry. *J. Virol.* 76: 9335-9344.
- Troesch, M., I. Meunier, P. Lapierre, N. Lapointe, F. Alvarez, M. Boucher and H. Soudeyns (2006). Study of a novel hypervariable region in hepatitis C virus (HCV) E2 envelope glycoprotein. *Virology* 352: 357-67.
- Tscherne, D. M., M. J. Evans, T. von Hahn, C. T. Jones, Z. Stamataki, J. A. McKeating, B. D. Lindenbach and C. M. Rice (2007). Superinfection exclusion in cells infected with hepatitis C virus. *J Virol* 81: 3693-703.
- Tscherne, D. M., C. T. Jones, M. J. Evans, B. D. Lindenbach, J. A. McKeating and C. M. Rice (2006). Time- and temperature-dependent activation of hepatitis C virus for low-pH-triggered entry. *J Virol* 80: 1734-41.

## U-V

- Van Itallie, C. M. and J. M. Anderson (2006). Claudins and epithelial paracellular transport. *Annu Rev Physiol* 68: 403-29.
- van Kooyk, Y. and T. B. Geijtenbeek (2003). DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. *Nat Rev Immunol* 3: 697-709.
- Vanwolleghem, T., J. Bukh, P. Meuleman, I. Desombere, J. C. Meunier, H. Alter, R. H. Purcell and G. Leroux-Roels (2008). Polyclonal immunoglobulins from a chronic hepatitis C virus patient protect human liver-chimeric mice from infection with a homologous hepatitis C virus strain. *Hepatology* 47: 1846-55.

- Vieyres, G., X. Thomas, V. Descamps, G. Duverlie, A. H. Patel and J. Dubuisson (2010). Characterization of the envelope glycoproteins associated with infectious hepatitis C virus. *J Virol* 84: 10159-68.
- Voisset, C., N. Callens, E. Blanchard, A. Op De Beeck, J. Dubuisson and N. Vu-Dac (2005). High density lipoproteins facilitate hepatitis C virus entry through the scavenger receptor class B type I. *J Biol Chem* 280: 7793-9.
- von Hahn, T., B. D. Lindenbach, A. Boullier, O. Quehenberger, M. Paulson, C. M. Rice and J. A. McKeating (2006). Oxidized low-density lipoprotein inhibits hepatitis C virus cell entry in human hepatoma cells. *Hepatology* 43: 932-42.
- von Hahn, T., J. C. Yoon, H. Alter, C. M. Rice, B. Rehermann, P. Balfe and J. A. McKeating (2007). Hepatitis C virus continuously escapes from neutralizing antibody and T-cell responses during chronic infection in vivo. *Gastroenterology* 132: 667-78.

## W

- Wakita, T., T. Pietschmann, T. Kato, T. Date, M. Miyamoto, Z. Zhao, K. Murthy, A. Habermann, H. G. Krausslich, M. Mizokami, R. Bartenschlager and T. J. Liang (2005). Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 11: 791-6.
- Weiner, A. J., M. J. Brauer, J. Rosenblatt, K. H. Richman, J. Tung, K. Crawford, F. Bonino, G. Saracco, Q. L. Choo, M. Houghton and et al. (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: 842-8.
- Wellnitz, S., B. Klumpp, H. Barth, S. Ito, E. Depla, J. Dubuisson, H. E. Blum and T. F. Baumert (2002). Binding of hepatitis C virus-like particles derived from infectious clone H77C to defined human cell lines. *J. Virol.* 76: 1181-93.
- Witteveldt, J., M. J. Evans, J. Bitzegeio, G. Koutsoudakis, A. M. Owsianka, A. G. Angus, Z. Y. Keck, S. K. Fong, T. Pietschmann, C. M. Rice and A. H. Patel (2009). CD81 is dispensable for hepatitis C virus cell-to-cell transmission in hepatoma cells. *J Gen Virol* 90: 48-58.

Wolf, M., M. Dimitrova, T. F. Baumert and C. Schuster (2008). The major form of hepatitis C virus alternate reading frame protein is suppressed by core protein expression. *Nucleic Acids Res* 36: 3054-64.

Wunschmann, S., J. D. Medh, D. Klinzmann, W. N. Schmidt and J. T. Stapleton (2000). Characterization of hepatitis C virus (HCV) and HCV E2 interactions with CD81 and the low-density lipoprotein receptor. *J. Virol.* 74: 10055-62.

Wyld, R., J. R. Robertson, R. P. Brettell, J. Mellor, L. Prescott and P. Simmonds (1997). Absence of hepatitis C virus transmission but frequent transmission of HIV-1 from sexual contact with doubly-infected individuals. *J Infect* 35: 163-6.

## X

Xu, Z., J. Choi, W. Lu and J. H. Ou (2003). Hepatitis C virus f protein is a short-lived protein associated with the endoplasmic reticulum. *J Virol* 77: 1578-83.

## Y

Yang, W., C. Qiu, N. Biswas, J. Jin, S. C. Watkins, R. C. Montelaro, C. B. Coyne and T. Wang (2008). Correlation of the tight junction-like distribution of Claudin-1 to the cellular tropism of hepatitis C virus. *J Biol Chem* 283: 8643-53.

Yu, M. Y., B. Bartosch, P. Zhang, Z. P. Guo, P. M. Renzi, L. M. Shen, C. Granier, S. M. Feinstone, F. L. Cosset and R. H. Purcell (2004). Neutralizing antibodies to hepatitis C virus (HCV) in immune globulins derived from anti-HCV-positive plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 7705-10.

## Z

Zeisel, M. B., H. Barth, C. Schuster and T. F. Baumert (2009). Hepatitis C virus entry: molecular mechanisms and targets for antiviral therapy. *Front Biosci* 14: 3274-85.

Zeisel, M. B., F. L. Cosset and T. F. Baumert (2008). Host neutralizing responses and pathogenesis of hepatitis C virus infection. *Hepatology* 48: 299-307.

Zeisel, M. B., S. Fafi-Kremer, I. Fofana, H. Barth, F. Stoll-Keller, M. Doffoel and T. F. Baumert (2007). Neutralizing antibodies in hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol* 13: 4824-4830.

- Zeisel, M. B., G. Koutsoudakis, E. K. Schnober, A. Haberstroh, H. E. Blum, F.-L. Cosset, T. Wakita, D. Jaeck, M. Doffoel, C. Royer, E. Soulier, E. Schvoerer, C. Schuster, F. Stoll-Keller, R. Bartenschlager, T. Pietschmann, H. Barth and T. F. Baumert (2007). Scavenger receptor BI 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., G. Randall, A. Higginbottom, P. Monk, C. M. Rice and J. A. McKeating (2004). CD81 is required for hepatitis C virus glycoprotein-mediated viral infection. *J Virol* 78: 1448-55.
- Zhang, P., C. G. Wu, K. Mihalik, M. L. Virata-Theimer, M. Y. Yu, H. J. Alter and S. M. Feinstone (2007). Hepatitis C virus epitope-specific neutralizing antibodies in Igs prepared from human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 8449-54.
- Zhang, P., L. Zhong, E. B. Struble, H. Watanabe, A. Kachko, K. Mihalik, M. L. Virata-Theimer, H. J. Alter, S. Feinstone and M. Major (2009). Depletion of interfering antibodies in chronic hepatitis C patients and vaccinated chimpanzees reveals broad cross-genotype neutralizing activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 7537-41.
- Zheng, A., F. Yuan, Y. Li, F. Zhu, P. Hou, J. Li, X. Song, M. Ding and H. Deng (2007). Claudin-6 and claudin-9 function as additional coreceptors for hepatitis C virus. *J Virol* 81: 12465-71.
- Zhong, J., P. Gastaminza, G. Cheng, S. Kapadia, T. Kato, D. R. Burton, S. F. Wieland, S. L. Uprichard, T. Wakita and F. V. Chisari (2005). Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 9294-9.
- Zignego, A. L., C. Ferri, S. A. Pileri, P. Caini and F. B. Bianchi (2007). Extrahepatic manifestations of Hepatitis C Virus infection: a general overview and guidelines for a clinical approach. *Dig Liver Dis* 39: 2-17.

## SUMMARY

Hepatitis C virus (HCV) is a major problem of public health. Approximately 170 million individuals are infected worldwide, and more than 70% of infected individuals will develop chronic hepatitis. The current treatment based on pegylated interferon- $\alpha$  and ribavirin can only cure 50 % of patients. HCV-related cirrhosis and hepatocellular carcinoma are a leading indication for liver transplantation (LT). The major limitation of LT is the universal re-infection of the liver graft. To date, there is no prophylactic strategy to prevent re-infection. A better understanding of the early phases of re-infection would allow developing of preventive strategies. During my PhD thesis, we focussed on the viral entry step to study the molecular mechanisms of re-infection of the liver graft. For the first time, we have demonstrated that during LT, selected variants re-infecting the liver graft show enhanced entry and escape from antibody-mediated neutralization. We identified two adaptive mutations in envelope glycoprotein E2 mediating enhanced entry and evasion of an highly infectious escape variant. These mutations markedly modulated CD81 receptor dependency resulting in enhanced viral entry. Among the host entry factors involved in viral entry, claudin 1 (CLDN1) is essential for HCV infection. We have produced monoclonal anti-CLDN1 antibodies and have shown that these antibodies specifically inhibit HCV entry from all major genotypes, as well as cell entry of the highly infectious escape variants of HCV that were resistant to autologous neutralizing antibodies. Taken together, these results suggest that targeting HCV entry into hepatocytes with specific monoclonal antibodies, as anti-CLDN1 antibodies, may constitute a novel antiviral approach to prevent primary HCV infection, such as after LT.

Key words: liver transplantation, viral entry, escape, host entry factors

## RESUME

Le virus de l'hépatite C (VHC) représente un problème de santé publique majeur. Environ 170 millions de personnes sont infectées dans le monde, et plus de 70% développeront une infection chronique. Le traitement actuel qui associe l'interféron- $\alpha$  pégylé et la ribavirine ne permet de guérir que 50% des patients tous génotypes confondus. Les complications de l'hépatite C chronique, la cirrhose et le carcinome hépatocellulaire, représentent des indications majeures de transplantation hépatique (TH). Malheureusement la récurrence de l'infection par le VHC sur le greffon est systématique et évolue vers une cirrhose en moins de 5 ans chez une proportion importante de patients. A l'heure actuelle, il n'y a pas de moyen de prévention de la réinfection du greffon par le VHC. Une meilleure connaissance des phases précoces de la réinfection permettrait le développement de stratégies préventives de l'infection par le VHC. Durant ma thèse nous nous sommes intéressés aux mécanismes de la réinfection par le VHC au cours de la TH en nous focalisant sur l'étape de l'entrée virale dans l'hépatocyte. Nous avons montré pour la première fois qu'au cours de la TH, et contrairement aux variants non sélectionnés après la greffe, les variants du VHC sélectionnés après la greffe (qui réinfectent le greffon) entrent plus efficacement dans la cellule hôte et échappent à la neutralisation induite par les anticorps des sérums autologues collectés avant la greffe. Nous avons, par la suite, identifié les mutations impliquées dans l'entrée et l'échappement viral aux anticorps neutralisants. Ces mutations favorisent l'entrée virale en modulant la dépendance du VHC à un des facteurs d'entrée virale, le CD81. La protéine de jonction Claudine 1 (CLDN1) est un autre facteur d'entrée essentiel à l'infection par le VHC. Nous avons produit des anticorps monoclonaux anti-CLDN1 et montré que ces anticorps inhibent de manière spécifique tous les génotypes du VHC ainsi que les variants viraux résistants à la neutralisation par le sérum autologue lors de la TH. L'ensemble de ces résultats suggère que l'étape d'entrée du virus pourrait constituer une cible prometteuse pour le développement de stratégies préventives de la réinfection du greffon par le VHC.

Mots clés : transplantation hépatique, entrée virale, échappement, facteurs d'entrée de l'hôte.

Résumé en anglais [au recto de la dernière page](#)