



UNIVERSITÉ DE STRASBOURG



ÉCOLE DOCTORALE 414

UMR_S 1110 Interactions virus-hôte et maladies hépatiques

Thèse présentée par
Catherine FAUELLE

Soutenue le : **02 décembre 2013**

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline: Sciences de la Vie et de la Santé
Aspects Moléculaire et Cellulaire de la Biologie

**Etude des facteurs viraux et cellulaires impliqués
dans l'échappement du virus de l'hépatite C au
cours de la transplantation hépatique**

THÈSE dirigée par :

Pr. BAUMERT Thomas F.

PU-PH, Directeur de l'unité Inserm U1110,
Université de Strasbourg

Pr. FAFI-KREMER Samira

PU-PH, Inserm U1110, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Pr. ASSELAH Tarik

PU-PH, Inserm U773, Clichy

Dr. PECHEUR Eve-Isabelle

CR, PhD, UMR Inserm 1052, CNRS 5286, Lyon

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Pr. RICCI Roméo

PU-PH, IGMBC, Strasbourg

Dr. DUONG François

CR, PhD, Département de Biomédecine, Hôpital
Universitaire de Bâle

Remerciements

C'est avec plaisir et émotion que je m'apprête à remercier ceux sans qui ce manuscrit n'aurait pas vu le jour. Cette thèse a été un investissement personnel, en temps et en énergie, mais également et surtout l'aboutissement d'un travail en équipe de trois ans et d'un soutien familial sans faille.

Je remercie tout d'abord le Pr Thomas Baumert pour m'avoir accueillie dans le laboratoire prestigieux qu'est l'unité Inserm 1110, où j'ai pu acquérir des compétences scientifiques diverses et solides.

Je remercie également chaleureusement tous les membres de mon jury de thèse pour avoir accepté de me consacrer de leur temps afin d'évaluer mon travail.

Ces trois ans n'auraient jamais été les mêmes sans l'énorme soutien que j'ai pu trouver auprès du Pr. Samira Fafi-Kremer. Je la remercie de tout cœur pour m'avoir fait partager ses expériences, pour m'avoir accordé de son temps (et toujours avec le sourire !) même quand son téléphone sonnait en continu ! Je la remercie surtout pour m'avoir fait confiance et m'avoir soutenue continuellement au fil de ces années.

Je remercie particulièrement Laura Heydmann pour avoir été là du début à la fin, pour avoir su me bousculer quand il le fallait et me consoler dans les moments difficiles. J'ai découvert chez Laura une formidable personnalité, avec beaucoup de courage, de volonté mais aussi de sensibilité. Je la remercie pour son efficacité et lui souhaite (bien que j'en sois d'ores et déjà certaine) une brillante réussite.

Je remercie Daniel Felmler (et oui Dan il faut parfois te rappeler que tu as un vrai prénom), pour le travail que nous avons effectué ensemble et sa profonde gentillesse. J'ai pu à ses côtés grandement apprendre et m'améliorer en anglais. Je le remercie pour avoir partagé ensemble le calvaire de la TCID₅₀ ! Je n'oublierai pas les 600 plaques 96 puits que nous avons lues ensemble ! Je le remercie sincèrement pour son amitié et lui souhaite tout l'épanouissement possible !

Je remercie les personnes de l'unité qui ont été une incroyable source de réconfort, de soutien mais également de rires et de partage ! Merci à Sarah, Laetitia, Charlotte, Emilie, Alizé, Christine ! Vous êtes formidables et gagnez toutes à être connues. Merci à Mathieu, Rajiv, Eloi, Lamine ! Bien que certaines conversations aient parfois été étranges vous êtes adorables !

Je suis très reconnaissante aux personnes qui s'occupent du bon fonctionnement de l'unité. Je remercie Dominique, Patricia, et Sigis qui ont toujours été disponibles. Je remercie également tout particulièrement Catherine C pour sa douceur et son aide précieuse.

Je remercie tous les autres membres de l'unité qui créent au quotidien une atmosphère de travail agréable et avec qui il a été un plaisir de travailler ou simplement de discuter.

Enfin, je ne serais jamais parvenue à accomplir tout ce travail sans le soutien ma famille.

Merci à mes parents pour leur tendresse et leur amour, pour m'avoir toujours soutenue au fil de mes études. Merci pour toutes vos petites marques d'attention et votre générosité. Désolée pour

le stress que j'ai pu vous causer et pour les nombreux déménagements ! Je suis très fière de vous et de notre famille. Merci de tout mon cœur.

Merci à Annie et Jean, Lydie et Didier pour m'avoir donné tant d'affection lorsque j'en avais besoin. Merci à vous pour avoir toujours cru en moi, avoir toujours su trouver les mots réconfortants et motivants. Merci Annie pour avoir comblé par ton amour le vide laissé par son départ. Il n'y aura jamais assez de mots pour vous exprimer ma reconnaissance.

Merci à Yahi pour avoir toujours cru en sa petite sœur. Merci pour avoir finalement accepté avec triste résignation que je doive travailler certains week-ends et jours fériés ! Merci pour tous ces petits « Je t'aime ma sœur » que tu sèmes régulièrement et qui sont si adorables.

Je remercie mon conjoint pour avoir été là ces cinq dernières années et pour son impressionnante patience. Merci Quentin d'être si compréhensif, de m'épauler chaque jour et de me soutenir dans les « petits coups de mou ». Désolée pour les moments difficiles que nous avons connus durant lesquels mon stress et mon angoisse ont été trop présents à la maison. Merci pour la patience dont tu feras encore preuve dans les années à venir !

Un énorme merci à Gilles et Sabine pour être toujours là dans les rires et dans le besoin. Merci à Mélanie et Laurent que j'adore !

Merci aux vieux amis et aux nouveaux. Un merci tout particulier à Luc, tu es formidable ! Merci à Céline (ma petite molécule), Caroline, Nico et Tiphaine.

Enfin je remercie ceux qui sont partis trop tôt. A ma Simone, Marc et Elie je leur envoie simplement tout mon amour.

Table des Matières

Introduction	- 5 -
Généralités	- 5 -
I. Historique et épidémiologie du HCV	- 5 -
II. Mode de transmission virale	- 6 -
III. Histoire naturelle de l'infection par le HCV	- 7 -
IV. Les traitements contre l'infection par le HCV	- 8 -
V. Les candidats vaccins	- 11 -
VI. HCV et transplantation hépatique	- 12 -
Le virus de l'hépatite C	- 16 -
I. Structure et génome du HCV	- 16 -
II. Les protéines du HCV	- 16 -
III. Hétérogénéité du HCV	- 22 -
Les modèles d'étude en laboratoire	- 24 -
I. Les modèles <i>in vitro</i>	- 24 -
II. Les modèles <i>in vivo</i>	- 27 -
Interactions HCV-cellule hôte : les acteurs d'une histoire complexe	- 30 -
I. Le cycle viral	- 30 -
II. Rôle majeur des lipides pour le HCV	- 38 -
III. HCV et réponses immunitaires : l'échappement du HCV	- 44 -
Contexte et objectifs de la thèse	- 50 -
Résultats et discussion	- 52 -
Partie 1 : Des mutations de l'enveloppe virale permettent de moduler simultanément l'utilisation du récepteur cellulaire CD81 et la neutralisation par les anticorps.	- 52 -
I. Résultats	- 53 -
II. Discussion	- 60 -
Partie 2 : L'apolipoprotéine E joue un rôle majeur dans l'échappement du HCV à la réponse humorale.	- 63 -
I. Résultats	- 64 -
II. Discussion	- 69 -
Conclusion générale et perspectives	- 71 -
Références	- 73 -
Annexes	- 109 -

Abréviations

apoA	Apolipoprotéine A
apoB	Apolipoprotéine B
apoC	Apolipoprotéine C
apoE	Apolipoprotéine E
CLDN1	Claudine 1
CM	Chylomicrons
DAA	Agent antiviral à action directe
DC	Cellule dendritique
RE	Réticulum endoplasmique
FBS	Sérum de veau fœtal
GFP	Green fluorescent protein
GPs	Glycoprotéines d'enveloppe
HAV	Virus de l'hépatite A
HBV	Virus de l'hépatite B
HCC	Carcinome hépatocellulaire
HCV	Virus de l'hépatite C
HCVcc	Virus de l'hépatite C produit en culture cellulaire
HCV-LP	Hépatite C like - particles
HCVpp	Pseudoparticule virale de l'hépatite C
HDL	Lipoprotéines de haute densité
HIV	Virus de l'immunodéficience humaine
HS	Héparanes sulfates
HSPG	Protéoglycanes à héparanes sulfates
HVR	Région hypervariable
IFN	Interféron
IRES	Site interne de liaison au ribosome

LD	Gouttelettes lipidiques
LDL	Lipoprotéines de faible densité
LDL-R	Récepteur des lipoprotéines de faible densité
LVP	Lipo-viro-particule
MHC	Complexe majeur d'histocompatibilité
MPA	Acide mycophénolique
nAbs	Anticorps neutralisants
OCLN	Occludine
pegIFN	Interféron pégylé
PEG	Polyéthylène glycol
PHH	Hépatocytes primaires humains
RBV	Ribavirine
SEM	Erreur type de la moyenne
SR-BI	Récepteur scavenger BI
SVR	Réponse virologique soutenue
TG	Triglycérides
TH	Transplantation hépatique
TRL	Lipoprotéines riche en triglycérides
uPA-SCID	Souris immunodéficientes combinées sévères
UTR	Région non traduite
VLDL	Lipoprotéines de très faible densité
VLP	Virus - Like - Particles

Résumé

La cirrhose et le carcinome hépatocellulaire liés au virus de l'hépatite C (HCV) sont des indications majeures de transplantation hépatique. Malheureusement, la réinfection du greffon par le HCV est systématique et sans moyen de prévention. Le développement de stratégies préventives est limité par les capacités du HCV à échapper au système immunitaire de l'hôte. Ces mécanismes par lesquels le virus échappe et réinfecte le greffon sont mal connus. Des travaux antérieurs du laboratoire ont démontré qu'au cours de la réinfection du greffon, seule une fraction des variants viraux est sélectionnée. Ces variants viraux présentent un avantage sélectif à la fois aux étapes d'attachement et d'entrée dans la cellule hôte, ainsi qu'au niveau de la neutralisation par les anticorps de l'hôte. L'objectif de ma thèse a été d'étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans l'efficacité d'entrée du HCV dans la cellule hôte et son échappement aux anticorps neutralisant (nAbs).

Dans la première partie de ma thèse nous avons caractérisé le rôle des interactions entre le HCV et les récepteurs cellulaires, dans l'entrée virale et l'échappement aux nAbs. L'entrée virale est la première étape du cycle du HCV et nécessite un grand nombre de facteurs de l'hôte. Cette étape est une cible majeure de la réponse immunitaire humorale. Notre étude a identifié un nouveau mécanisme d'échappement du HCV dans lequel l'utilisation des facteurs d'entrée cellulaires évolue simultanément avec les capacités du HCV à échapper aux nAbs. Ces résultats apportent une meilleure compréhension de l'infection par le HCV et seront utiles à l'élaboration de nouvelles stratégies antivirales et vaccinales.

Dans la seconde partie de ma thèse, nous avons émis l'hypothèse que le HCV pourrait bénéficier de son association avec les lipoprotéines de l'hôte pour masquer les épitopes des glycoprotéines d'enveloppe virale et échapper aux nAbs. En effet, le HCV circule dans le sang sous forme de particules virales associées aux lipoprotéines riches en triglycérides, appelées lipo-viro-particules. Cette association facilite les interactions entre le virus et certains facteurs cellulaires nécessaires à l'entrée virale. Cependant, la nature de l'association entre les lipoprotéines et le HCV et son impact sur la physiopathologie de l'infection ne sont pas connus à ce jour. Dans notre étude, nous avons identifié pour la première fois l'implication d'une apolipoprotéine dans l'échappement viral à la réponse humorale et dans la persistance du HCV. Cette découverte démontre que l'interaction virus-lipoprotéines est un mécanisme majeur d'échappement et suggère que certains composants des lipoprotéines devraient être intégrés dans le développement de nouveaux vaccins candidats.

Ce travail de thèse a permis d'identifier de nouveaux facteurs viraux et cellulaires impliqués dans la persistance virale chez les patients chroniquement infectés par le HCV, et apporte de nouvelles perspectives dans le développement de stratégies vaccinales efficaces.

Introduction

Généralités

I. Historique et épidémiologie du HCV

Dans les années 1960, le virus de l'hépatite A (HAV pour *hepatitis A virus*) et le virus de l'hépatite B (HBV pour *hepatitis B virus*) étaient les seuls agents pathogènes connus responsables d'hépatites virales. L'absence de test diagnostique obligeait les médecins à discriminer les deux types d'infections en fonction des circonstances de l'infection ainsi que de la durée d'incubation (Seeff, 2009). Le développement de tests sérologiques permettant de discriminer les infections par le HAV et le HBV dans les années 1970, a montré que la majorité des hépatites transmises par voie parentérale, n'était due à aucun de ces deux virus mais à un troisième agent pathogène inconnu (Feinstone et al., 1975). Dix ans plus tard, un immunocriblage de banque d'expression d'ADNc a été réalisé par l'équipe du Professeur Houghton et a abouti à l'isolation d'un clone d'ADNc de petite taille. Un alignement de séquence de cet ADNc mettra en évidence des homologies de séquences avec certains membres des flavivirus à ARN simple brin positif tel que le virus de la dengue et le virus de la fièvre jaune (Houghton, 2009). C'est en 1989 que le virus de l'hépatite C (HCV pour *hepatitis C virus*) a finalement été identifié comme un agent majeur responsable d'hépatite virale (Choo et al., 1989).

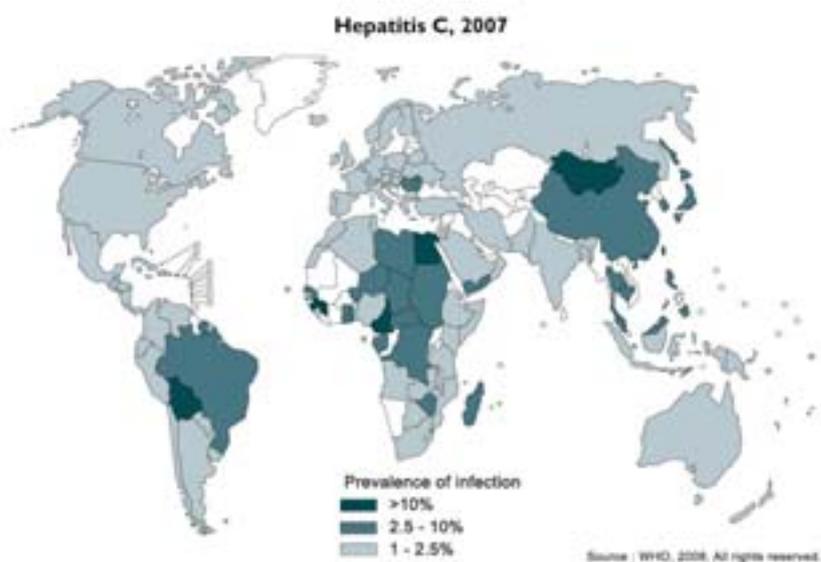


Figure 1. La prévalence du HCV dans le monde.

Aujourd'hui, le nombre de personnes infectées par le HCV à travers le monde est estimé à plus de 170 millions (Chisari, 2005). Avec 3 à 4 millions de personnes nouvellement infectées chaque année, le HCV représente un problème majeur de santé publique. De manière globale, avec un pourcentage de 4.7%, le Moyen-Orient possède la plus haute prévalence d'hépatite C, devant l'Afrique (3.2%), l'Europe (2.3%) et les Amériques (1.5%) (Lavanchy, 2011) (Figure 1). Cependant, d'importantes variabilités sont observées en fonction des pays. Ces différences peuvent être expliquées par des populations à risque en augmentation ou encore par l'absence de mise en place de mesures de prévention. Par exemple, des taux très élevés d'hépatite C sont observés en Chine à cause d'une augmentation de l'usage de drogues injectées, ainsi qu'en Egypte à cause d'une contamination en masse lors d'une campagne anti-schistosomes (Lavanchy, 2011; Pybus et al., 2003). Ces chiffres sont probablement sous-évalués de part l'absence de données dans certains pays (71% des pays africains). Ces mêmes zones sont également les plus susceptibles de développer des taux élevés d'infection par le HCV, de part des dons sanguins peu contrôlés ainsi qu'un dépistage chez les personnes très limité (Fauvelle et al., 2013).

II. Mode de transmission virale

Le HCV se transmet essentiellement par voie parentérale. Avant l'instauration du dépistage systématique des dons sanguins au début des années 1990, de nombreux patients ont été contaminés par le HCV lors de transfusions sanguines (Donahue et al., 1992). L'usage de seringues contaminées dans les populations toxicomanes représente également un risque majeur de transmission du HCV, de même que de mauvaises procédures de stérilisations au cours d'interventions médicales ou chirurgicales. La transmission du virus de la mère à l'enfant au cours de la grossesse varie d'un taux de 4 à 7% (Roberts and Yeung, 2002). Enfin, contrairement au virus de l'immunodéficience humaine (HIV pour *human immunodeficiency virus*), la transmission du HCV par voie sexuelle est très rare (Terrault et al., 2013 ; (Vandelli et al., 2004). Il est important de noter que par certains modes de contamination similaires, de nombreuses personnes HCV positives présentent des co-infections avec le HIV, notamment dans les pays en voie de développement. Ces patients sont caractérisés par une hépatite plus sévère et des traitements plus difficiles à mettre en place. De ce fait, le HCV émerge comme une cause majeure de mortalité non liée au SIDA (pour *syndrome de l'immunodéficience acquise*) chez les patients infectés par le HIV (Vellozzi et al., 2011).

III. Histoire naturelle de l'infection par le HCV

L'infection par le HCV engendre une hépatite aiguë qui bien qu'asymptomatique dans la majorité des cas, peut causer des signes d'infection chez environ 30% des individus tels que de la fatigue, des nausées et des symptômes grippaux. Rapidement dès les premières semaines suivant l'infection, l'ARN viral peut être détecté dans le sang et peu de temps après, le taux des transaminases s'élève pour atteindre plus de 10 fois le seuil normal (Hoofnagle, 1997). Les réponses immunitaires cellulaires de l'hôte dirigées contre le HCV, tel que les lymphocytes T, sont détectables dans les 5 à 9 semaines suivant l'infection, de même que les réponses immunitaires humorales qui peuvent être également détectées dans les 8 semaines suivant l'infection. Cette apparition des anticorps peut toutefois s'avérer plus tardive chez certains patients (Rehermann, 2009; Zeisel et al., 2009).

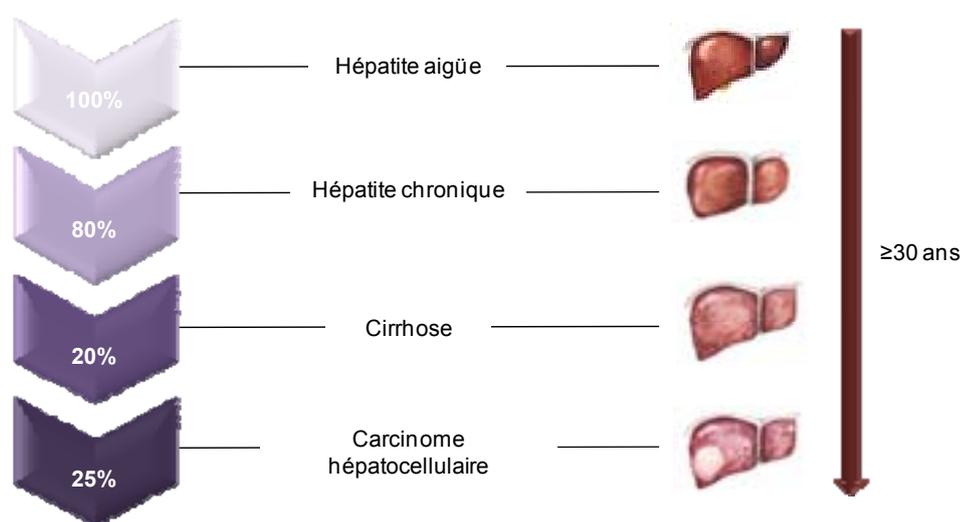


Figure 2. Histoire naturelle de l'infection par le HCV. Après l'infection initiale, environ 80% des personnes vont développer une hépatite chronique. Pour au moins 20% des personnes atteintes d'hépatite chronique, la maladie va évoluer vers une cirrhose hépatique et finalement, aboutir à un carcinome hépatocellulaire chez 25% d'entre eux.

Au final, seules 15-20% des personnes infectées parviennent à éliminer de manière spontanée le virus alors que chez la grande majorité, le virus va persister et une hépatite chronique va se développer (Figure 2) (Seeff, 2002). L'hépatite chronique est caractérisée par des degrés variables d'inflammation hépatique et de fibrose. Les associations observées de l'hépatite C chronique à des insulino-résistances (définies comme des réactions diminuées à l'insuline) ainsi que des stéatoses hépatiques (définies comme une augmentation de la matière grasse dans le foie) ont été décrites comme des facteurs favorisant la progression de la fibrose (Machado and Cortez-Pinto, 2009). En l'absence de dépistage de l'infection et donc de mise en place d'un traitement, environ 20 à 30 ans après l'infection initiale et chez 20% des individus,

l'hépatite C chronique va progresser vers une cirrhose hépatique (Seeff, 2002) qui pourra elle-même évoluer vers un carcinome hépatocellulaire (HCC pour *hepatocellular carcinoma*).

Le HCC est la troisième cause de mortalité liée à un cancer dans le monde et provoque chaque année jusqu'à 600 000 décès. En raison de son mauvais pronostic le taux de mortalité est identique au nombre de nouveaux cas diagnostiqués chaque année, soit 626 000 (Venook et al., 2010). Le HCV est un facteur de risque majeur de HCC par la combinaison de deux mécanismes. Le premier mécanisme, indirect, où l'infection persistante par le HCV provoque une inflammation chronique qui induit une accélération de la prolifération cellulaire et de la fibrogénèse. Le deuxième mécanisme, direct, où les protéines du HCV perturbent les voies de signalisation impliquées aussi bien dans le métabolisme cellulaire que dans le contrôle du cycle cellulaire (Buhler and Bartenschlager, 2012). La cirrhose et le HCC causés par le HCV ont ainsi émergé comme des causes majeures de transplantation hépatique (TH), à l'origine de 20 à 30% des transplantations effectuées en Europe et en Amérique du Nord (Muhlberger et al., 2009).

IV. Les traitements contre l'infection par le HCV

En l'absence de vaccin contre le HCV, les méthodes de défense contre cette maladie reposent entièrement sur l'efficacité des traitements. Jusqu'à aujourd'hui, la combinaison de l'interféron alpha pegylé (pegIFN) (la pégylation permettant d'augmenter la demi-vie de l'IFN) avec un antiviral à large spectre, la ribavirine (RBV), constituait le traitement standard des patients. Cependant, ce traitement est mal toléré et son efficacité est limitée à une fraction d'individus. En effet, alors que 80% des patients infectés avec un HCV de génotype 2 et 3 parviennent à atteindre une réponse virale soutenue (SVR pour *sustained virological response*, définie comme une charge virale indétectable après la fin du traitement), seuls 45 à 50% des patients infectés avec un HCV de génotype 1 y parviennent sous ce traitement (Zeuzem, 2008).

Il a également été démontré que l'origine ethnique des patients a une influence sur la réponse au traitement pegIFN/RBV (Ge et al., 2009). Les patients d'origine européenne ont une probabilité supérieure d'être guéris par rapport aux patients d'origine africaine. Pour expliquer ces différences, des déterminants génétiques de réponse aux traitements ont été recherchés et il a pu être mis en évidence un polymorphisme génétique à proximité du gène de l'IL28B associé à une réponse aux traitements deux fois plus efficace. Ce polymorphisme est fréquemment retrouvé dans la population européenne (Ge et al., 2009 ; Pasha et al., 2013).

Depuis 2011, le traitement de l'hépatite C chronique a connu une avancée majeure avec le développement de nouveaux antiviraux à action directe (DAA pour *direct acting antiviral*) dirigés contre les protéines du HCV (ex : antiprotéases). La prise en charge des patients infectés par le HCV génotype 1 a grandement été améliorée par la combinaison du traitement pegIFN/RBV

avec le télaprévir ou le bocéprévir, deux DAA récemment mis sur le marché. Cette combinaison a permis d'atteindre des taux de SVR de 69 à 75% avec le télaprévir et de 67 à 68% avec le bocéprévir (Jacobson et al., 2011 ; Lee et al., 2012; Poordad et al., 2011). Bien qu'efficaces, ces molécules présentent néanmoins d'importantes limites : leurs effets secondaires, l'émergence de mutations résistantes, le coût élevé et la complexité des schémas thérapeutiques restreignent leur utilisation à une population plus large. Des essais thérapeutiques évaluant l'efficacité de diverses combinaisons de DAA dirigés contre d'autres protéines virales avec ou sans pegIFN/RBV visant à dépasser les limites actuelles des DAA sont actuellement en cours (Chatel-Chaix et al., 2012; Lok et al., 2012). Des thérapies utilisant des DAAs sans IFN seront probablement mises sur le marché dans les prochaines années (Asselah and Marcellin, 2013 ; Stedman, 2013).

Une autre stratégie thérapeutique permettant d'éviter les problèmes de résistances virales, consiste à cibler des facteurs de l'hôte (Zeisel et al., 2013). Plusieurs candidats sont actuellement en développement voire en phase clinique. Parmi eux, plusieurs inhibiteurs non immunosuppresseurs de la cyclophiline A, une protéine enzymatique jouant un rôle critique pour la réplication virale, ont été mis au point dont l'alisporivir, le SCY-365 et le NIM 811 (Fischer et al., 2010). Bien que ces molécules présentent d'importantes similarités structurales, les résultats cliniques ont montré des variabilités d'efficacité antivirale et de tolérance. L'alisporivir (Debio025) apparaît comme le candidat le plus prometteur. Plusieurs essais thérapeutiques ont évalué l'efficacité du Debio025 seul ou bien en combinaison avec le pegIFN ou le traitement pegIFN/RBV. L'utilisation en monothérapie du Debio025 sur des patients co-infectés (génotype 1, 3 et 4) avec le HIV a montré une diminution de la virémie de $-3,63 \log_{10}$ copies/ml après 15 jours de traitement à 1200 mg (Flisiak et al., 2008). Ces résultats encourageants ont mené à l'étude des effets du Debio025 en combinaison avec le pegIFN, sur une cohorte de patients mono-infectés et non-traités pour le HCV. Les résultats ont montré un effet additif de la combinaison pegIFN/Debio025 à 600 et 1000 mg après 4 semaines, avec un effet maximal sur les génotypes 2 et 3 et une diminution de la virémie de $-5,91$ et $-5,89 \log_{10}$ IU/ml respectivement (Flisiak et al., 2009). Enfin, un autre essai thérapeutique évalue l'efficacité de la combinaison pegIFN/RBV/Debio025 sur des patients infectés par un HCV génotype 1 et non répondeurs aux traitements standard. Des résultats préliminaires indiquent une suppression de la virémie après 4 semaines de traitement à 800mg d'alisporivir (NCT01183169) (Gallay and Lin, 2013).

L'inhibition de la fusion virale représente également une cible intéressante dans le développement d'antiviraux et plusieurs molécules antivirales ont été décrites. Les phénothiazines inhiberaient *in vitro* la fusion virale en augmentant la fluidité membranaire de la cellule cible (Chamoun-Emanuelli et al., 2013). L'arbidol inhibe la fusion virale en étant capable à la fois de lier les phospholipides des membranes lipidiques mais également d'interagir avec les

acides aminés aromatiques des GP. L'arbidol va ainsi modifier la fluidité membranaire et perturber les réarrangements structuraux des GP nécessaires à la fusion (Teissier et al., 2011).

Le micro ARN 122 (miR-122) est un facteur essentiel à la réplication virale. Une nouvelle drogue, le miravirsén, inhibiteur de la biogenèse de miR-122 (Gebert et al., 2013), a été testée chez des patients chroniquement infectés par un génotype 1 sur 29 jours. Les résultats ont montré une diminution dose dépendante de l'ARN du HCV avec une efficacité maximale à 7mg/kg de miravirsén (diminution en moyenne de $-3 \log_{10}$ IU/ml) sans effets secondaires majeurs (Janssen et al., 2013). Aucune résistance virale n'a été observée (Janssen et al., 2013).

Enfin une autre approche consiste à empêcher l'entrée virale en ciblant les récepteurs cellulaires nécessaires au HCV. Dans cette optique, une molécule (ITX 5061) dirigée contre un des récepteurs du HCV, le récepteur scavenger-BI (SR-BI), a été développée pour ses capacités d'inhibition de l'infection par le HCV *in vitro* (Syder et al., 2011 ; Zhu et al., 2012). L'ITX 5061 a été testé dans un essai clinique de phase I dans le but d'évaluer sa tolérance et son efficacité sur des patients chroniquement infectés par un HCV génotype 1 (Sulkowski et al., 2013). Malgré la bonne tolérance du traitement, son efficacité antivirale aux doses étudiées (150, 75 et 25 mg/jour) reste faible. En effet seul un patient traité avec 150 mg par jour d'ITX 5061 durant 28 jours a montré une diminution de l'ARN du HCV d'environ $1,5 \log_{10}$ IU/ml (Sulkowski et al., 2013). Les capacités de l'ITX 5061 à prévenir la réinfection du greffon chez des patients nécessitant une transplantation hépatique est actuellement en cours (NCT01292824). Actuellement, un essai clinique est mis en place afin d'évaluer les effets de l'erlotinib, inhibiteur de l'EGFR (pour *epidermal growth factor receptor*), chez des patients infectés chroniquement par le HCV (NCT01835938).

Plusieurs anticorps ciblant les récepteurs cellulaires sont également en développement et présentent des résultats très encourageants *in vitro* et *in vivo* (Meuleman et al., 2012). Le CD81 est un récepteur essentiel à l'entrée du HCV dans les hépatocytes. Plusieurs anticorps ciblant ce récepteur ont ainsi été développés. Le traitement prophylactique de souris avec des anticorps anti-CD81 a montré la capacité de ces anticorps à prévenir complètement l'infection par différents génotypes HCV (Meuleman et al., 2008). Récemment, Fofana et al ont également développé d'autres anticorps anti-CD81 capables d'inhiber efficacement la dissémination virale *in vitro* (Fofana et al., 2013a). Meuleman et al. ont également développé des anticorps anti-SR-BI capables d'inhiber efficacement l'infection et la dissémination virale *in vitro* et *in vivo* ainsi que de prévenir l'infection par le HCV *in vivo* (Meuleman et al., 2012). L'intégration de ces différents anticorps dans une thérapie combinée au traitement pegIFN/RBV ou avec des DAA pourrait augmenter l'efficacité antivirale et limiter le développement des résistances.

Cette approche consistant à cibler les éléments de l'hôte dans la lutte antivirale est relativement nouvelle et soulève la question de tolérance des différents composés. Cependant

les effets secondaires actuellement décrits, bien que présents, ne sont pas supérieurs à ceux du traitement standard (pegIFN/RBV +/- DAAs).

V. Les candidats vaccins

Le système immunitaire joue un rôle majeur dans le contrôle de l'infection par le HCV. Un vaccin protecteur doit être capable d'induire des réponses immunitaires humorales et cellulaires efficaces (Barth et al., 2011; Osburn et al., 2010; Pestka et al., 2007; Raghuraman et al., 2012). Cependant la variabilité ainsi que les capacités d'adaptation du HCV sont de véritables défis dans le développement d'un vaccin contre ce virus. Différents épitopes des protéines du HCV induisent des réponses immunitaires spécifiques. Les protéines structurales sont les premières cibles des réponses humorales tandis que les réponses cellulaires T ciblent plutôt les protéines non-structurales. Plusieurs candidats vaccins contre le HCV ont été développés basés sur différentes combinaison d'antigènes (protéines structurales et non-structurales) et différents systèmes (peptides, HCV-LP, vecteurs viraux).

Plusieurs études se sont basées sur l'utilisation des peptides du HCV telles que la protéine core ou les GPs E1E2 purifiées (Choo et al., 1994; Drane et al., 2009; Frey et al., 2010). Des résultats encourageants ont pu être obtenus sur des chimpanzés avec l'induction de réponses immunitaires humorales fortes ainsi qu'une protection des animaux contre la réinfection (Choo et al., 1994). Chez l'homme, une immunisation utilisant les GPs E1E2 (génotype 1a) adjuvantées induit des nAbs ainsi qu'une prolifération des cellules T CD4+ (Frey et al., 2010). Des expériences de neutralisation *in vitro* ont par ailleurs montré que ces nAbs induits seraient capables de protéger contre une réinfection par des souches hétérologues du HCV (Law J, 2012; Stamatakis et al., 2011). Cependant, ces peptides purifiés présentent d'importantes différences de conformation et d'immunogénicité par rapport aux protéines virales natives.

Afin de contourner cette difficulté, des *virus-like particles* (VLPs) ont été développées (Chua et al., 2012; Elmowalid et al., 2007; Garrone et al., 2011; Reyes-Del Valle et al., 2012). Ces VLPs sont constituées des protéines structurales du HCV assemblées dans une enveloppe et ne contenant pas de génome viral. Ces VLPs peuvent induire à la fois des réponses immunitaires humorales et cellulaires chez la souris et les primates (Jeong et al., 2004; Murata et al., 2003). Elmowalid et al. ont notamment observé que des chimpanzés immunisés avec des HCV-LP étaient capables de contrôler rapidement l'infection par le HCV et d'éliminer le virus. Ces animaux ont développé des réponses cellulaires T spécifiques et efficaces (Elmowalid et al., 2007). Récemment, une approche très intéressante a été de développer des protéines chimères HBV-HCV (Beaumont et al., 2012). Les domaines transmembranaires des protéines E1E2 du HCV ont été insérés en N-ter de la protéine d'enveloppe S du HBV, afin d'obtenir des protéines

d'enveloppe chimériques. La protéine S du HBV est capable de s'auto-assembler et de former des particules hautement immunogènes. Le vaccin actuel contre le HBV est basé sur cette protéine S et protège efficacement contre ce virus. Chez le lapin, les particules chimères HBV-HCV sont capables d'induire des réponses immunitaires humorales spécifiques contre les protéines d'enveloppe du HBV et du HCV. Ces nAbs présentent également des capacités de neutralisation croisée (Beaumont et al., 2012). Au final, cette approche permettrait le développement d'un vaccin prophylactique bivalent capable de prévenir l'infection à la fois par le HBV et le HCV.

Des vecteurs viraux sont également en développement. Des virus comme les adénovirus, sont modifiés afin de coder pour les protéines du HCV. Ces virus présentent l'avantage d'être hautement immunogènes. Etant donné que les infections par les adénovirus sont courantes, ces vaccins doivent être basés sur des sérotypes rares d'adénovirus tel que l'adénovirus 6 humain (Ad6) ainsi que l'adénovirus 3 du chimpanzé (ChAd3) (Barnes et al., 2012 ; Colloca et al., 2012; Folgari et al., 2006). Cette stratégie est développée dans le but d'induire des réponses cellulaires T spécifiques et utilise ainsi plusieurs épitopes T identifiés dans les protéines non-structurales du HCV. Un essai chez le chimpanzé a démontré une virémie cent fois plus faible chez les animaux vaccinés. De même pour 3 des 4 chimpanzés vaccinés, la virémie a été de courte durée et non associée à une augmentation des enzymes hépatiques suggérant l'absence d'hépatite aigüe (Folgari et al., 2006). Chez l'homme, des cellules CD4+ et CD8+ sont également induites et sécrètent de nombreuses cytokines (IL-2, IFN- γ , TNF- α) (Barnes et al., 2012). De plus ces réponses cellulaires T sont capables de cibler plusieurs épitopes et de reconnaître des souches virales différentes (Barnes et al., 2012).

Bien que l'arrivée des DAA ait considérablement amélioré le traitement de l'hépatite C, le développement d'un vaccin contre le HCV reste essentiel afin de contrôler l'infection par le HCV notamment dans les populations où la prévalence du HCV est élevée et les traitements peu accessibles (Fauvelle et al., 2013). Bien que les candidats vaccins actuels soient prometteurs, une meilleure compréhension de la nature des particules virales ainsi que des mécanismes d'échappement du HCV est nécessaire.

VI. HCV et transplantation hépatique

La cirrhose au stade terminal et le HCC associés au HCV sont les indications majeures de TH en Europe et aux Etats-Unis. Chaque année plus de 10 000 TH sont réalisées en Europe. Ces dix dernières années, la prévalence des TH a également fortement augmenté. Le délai entre la contamination et la survenue des complications hépatiques nécessitant une TH suggère que le

pic de l'impact social et économique de l'épidémie du HCV surviendra probablement dans les 10 à 20 prochaines années (Davis et al., 2010).

Après TH la réinfection du greffon est systématique. Chez 75% des patients greffés une fibrose précoce se développe. Cette fibrose évolue vers une cirrhose chez 20 à 30% d'entre eux dans les 5 années qui suivent la greffe. L'accélération de la progression de la maladie est due à plusieurs facteurs de l'hôte et du donneur (notamment leur âge) ainsi qu'à des facteurs viraux. L'impact du titre viral chez le patient au moment de la transplantation semble être un paramètre important déterminant la survie du greffon et du patient. Un titre infectieux élevé serait délétère à la réussite de la TH, et il serait ainsi important de traiter efficacement les patients afin d'obtenir une SVR avant de réaliser la transplantation (Charlton et al., 1998).

Les glucocorticoïdes sont couramment donnés aux patients lors d'une TH en association avec d'autres immunosuppresseurs afin d'éviter les rejets de greffe. Cependant, il a été observé que ce traitement augmente de 4 à 100 fois le taux de l'ARN viral dans le sérum (Hsu et al., 2013). Récemment, Ciesek et al. ont montré que les glucocorticoïdes augmentent spécifiquement l'entrée du HCV par une surexpression des facteurs d'entrée du virus (SR-BI et occludine), favorisant ainsi la dissémination virale. Ces données peuvent expliquer en partie l'élévation de la charge virale qui accompagne les bolus de corticoïdes administrés aux patients transplantés (Ciesek et al., 2010). Par ailleurs, une étude rétrospective a montré que l'administration de corticostéroïdes est associée à une récurrence plus rapide et plus sévère de l'hépatite C (Rosen et al., 1997). Il est ainsi essentiel dans le cadre de la TH liée au HCV de limiter l'utilisation de ces anti-inflammatoires et immunosuppresseurs afin d'éviter une récurrence sévère du HCV et une augmentation du titre viral (Hsu et al., 2013).

A l'inverse il semble que d'autres agents immunosuppresseurs tel que l'acide mycophénolique (MPA), auraient un effet antiviral contre le HCV. Le MPA est capable d'inhiber l'infection virale à 75 % *in vitro* (Henry et al., 2006) ainsi que d'inhiber efficacement la réplication virale dans le modèle murin (Pan et al., 2012). Cette drogue induit l'expression de gènes stimulés par l'IFN et possède un effet synergique avec l'IFN sur la réplication virale (Pan et al., 2012). La cyclosporine A (CsA) est également un immunosuppresseur capable d'inhiber la réplication virale en interagissant avec les cyclophilines (Kaul et al., 2009). *In vitro*, l'utilisation combinée du MPA et de la CsA permet d'obtenir un effet synergique avec une inhibition de la réplication de 90% (Henry et al., 2006).

A ce jour il n'existe pas de moyen de prévention de la réinfection du greffon et les possibilités thérapeutiques pour traiter les patients sont extrêmement limitées. Une stratégie serait d'éliminer le virus chez ces patients avant d'effectuer la TH et de limiter ainsi les risques de récurrence. Cependant, ces patients présentent un stade avancé de la maladie (cirrhose décompensée,

HCC) pour lequel les traitements standards sont contre-indiqués. En 2009, une étude a évalué les effets d'un traitement pegIFN/RBV sur des patients avec une cirrhose décompensée et en attente d'une TH. Seulement 29% des patients présentaient des taux d'ARN viral indétectables au moment de la TH et 20% ont atteint une SVR après TH (Carrion et al., 2009). En plus de son efficacité relativement faible, le traitement de ces patients avec le pegIFN/RBV induit des effets secondaires sévères et augmente le risque de développer une infection bactérienne (Carrion et al., 2009).

Le traitement des patients après la TH est également complexe. Plusieurs études ont évalué l'efficacité du traitement pegIFN/RBV chez les patients après TH. Dans l'ensemble, le taux moyen de SVR chez ces patients sous ce traitement est de 30,2% avec une fréquence élevée d'effets secondaires nécessitant une diminution des doses voir un arrêt du traitement (Berenguer, 2008). Récemment, deux études encourageantes ont été publiées sur les effets positifs du bocéprévir et du télaprévir en combinaison avec le traitement pegIFN/RBV chez des patients transplantés. Cette triple thérapie permet d'atteindre des taux de réponse virologique de 50 à 60% (Pungpapong et al., 2013) voire de 72% chez des patients traités avec du bocéprévir (Coilly et al., 2012). Cependant la sévérité des effets secondaires et les décès observés chez un nombre significatif de patients ne sont pas en faveur d'une utilisation systématique de ce traitement chez les patients transplantés (Coilly et al., 2012; Pungpapong et al., 2013). De plus, le bocéprévir et le télaprévir peuvent interagir fortement avec certains immunosuppresseurs notamment le tacrolimus, rendant la prise en charge clinique des patients transplantés encore plus complexe (Crespo et al., 2012).

Une étude menée par Chung et al. a évalué les effets d'un anticorps monoclonal anti-E2 (MBL-HCV1) administré aux patients directement après la TH (Chung et al., 2013). Les patients ont reçu trois perfusions le jour de la TH puis une perfusion quotidienne jusqu'au jour 7 après TH. Une dernière perfusion a été réalisée au quatorzième jour après TH. Malgré une baisse de la charge virale ($-3,07$ à $-3,34 \log_{10}$ IU/ml ; J+3 à J+6 après TH) un rebond a été observé chez tous les patients (Chung et al., 2013). Ce rebond est expliqué par l'apparition de variants résistants (Chung et al., 2013).

Neumann et al. ont également décrit le cas très intéressant d'un patient ayant subi une TH et traité rapidement après la greffe par un composé naturel, la silibinine. Cette molécule a été identifiée pour ses propriétés d'inhibition de l'entrée du HCV en altérant l'endocytose médiée par la clathrine (Blaising et al., 2013a). Chez ce patient, la silibinine a été injectée 8h après transfusion et seulement 9 jours plus tard l'ARN viral n'était plus détecté (Neumann et al., 2010). Ce traitement a permis d'induire une SVR étant donné que 6 mois après l'intervention l'ARN était toujours indétectable et aucune lésion hépatique n'a été observée (Neumann et al., 2010). Ce patient bénéficiait néanmoins d'une charge virale relativement basse avant transplantation, apportant un pronostic favorable.

Bien que l'arrivée de nouveaux antiviraux ait amélioré le pronostic vital des patients transplantés, leur prise en charge reste complexe. D'autres recherches et solutions thérapeutiques sont nécessaires afin de parvenir à bloquer efficacement l'infection du greffon après la TH.

Le virus de l'hépatite C

I. Structure et génome du HCV

Le HCV, tout comme le virus GB de type B (GBV-B) est classé dans le genre *Hepacivirus* de la famille des *Flaviviridae*, qui comporte également les genres *Flavivirus*, *Pestivirus* et *Pegivirus*. Le HCV est un virus enveloppé à ARN monocaténaire de polarité positive de 9.6 kb, composé d'une région en 5' non traduite (5'UTR pour *untranslated region*) incluant un site d'entrée interne du ribosome (IRES pour *internal ribosome entry site*), un cadre ouvert de lecture codant pour la polyprotéine virale et une région en 3' non traduite (3'UTR) (Penin et al., 2004). La particule virale mesure 55 à 65 nm de diamètre (Catanese et al., 2013b; Kaito et al., 1994). Les GPs E1 et E2 du HCV sont insérées dans une enveloppe lipidique dérivant de l'hôte. La nucléocapside est composée de la protéine de capsid core et de l'ARN du HCV (Figure 3A). Le HCV circule chez les patients en association avec des lipoprotéines, formant des lipo-viro-particules (LVP). Ces associations résultent en une importante variabilité morphologique du HCV, avec des densités hétérogènes allant de 1,03 à 1,10 g/ml (Figure 3B) (Catanese et al., 2013b ; Lindenbach, 2013).

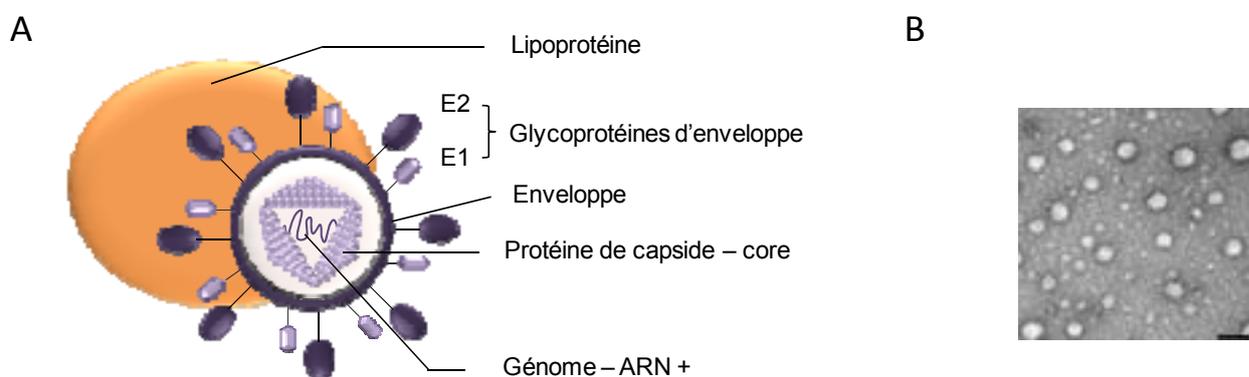


Figure 3. Représentation schématique du HCV (A). Le HCV est composé des GPs E1 et E2 insérées dans une enveloppe lipidique elle-même entourant une capsid composée de la protéine core et contenant le génome ARN du virus. **(B)** Images de particules virales. Cette image obtenue en microscopie électronique à partir de virus produits en culture cellulaire (Catanese et al., 2013b), montre bien l'importante hétérogénéité morphologique des virions. L'échelle correspond à 100 nm.

II. Les protéines du HCV

Le génome du HCV code une polyprotéine précurseur d'environ 3 000 acides aminés, qui est clivée de manière co- et post-traductionnelle par des protéases virales et cellulaires en protéines structurales (Core, E1 et E2) et non structurales (p7, NS2, NS3, NS4A/B et NS5A/B) (Moradpour

et al., 2007; Penin et al., 2004) (Figure 4A). La figure 4B résume les fonctions des différentes protéines du HCV.

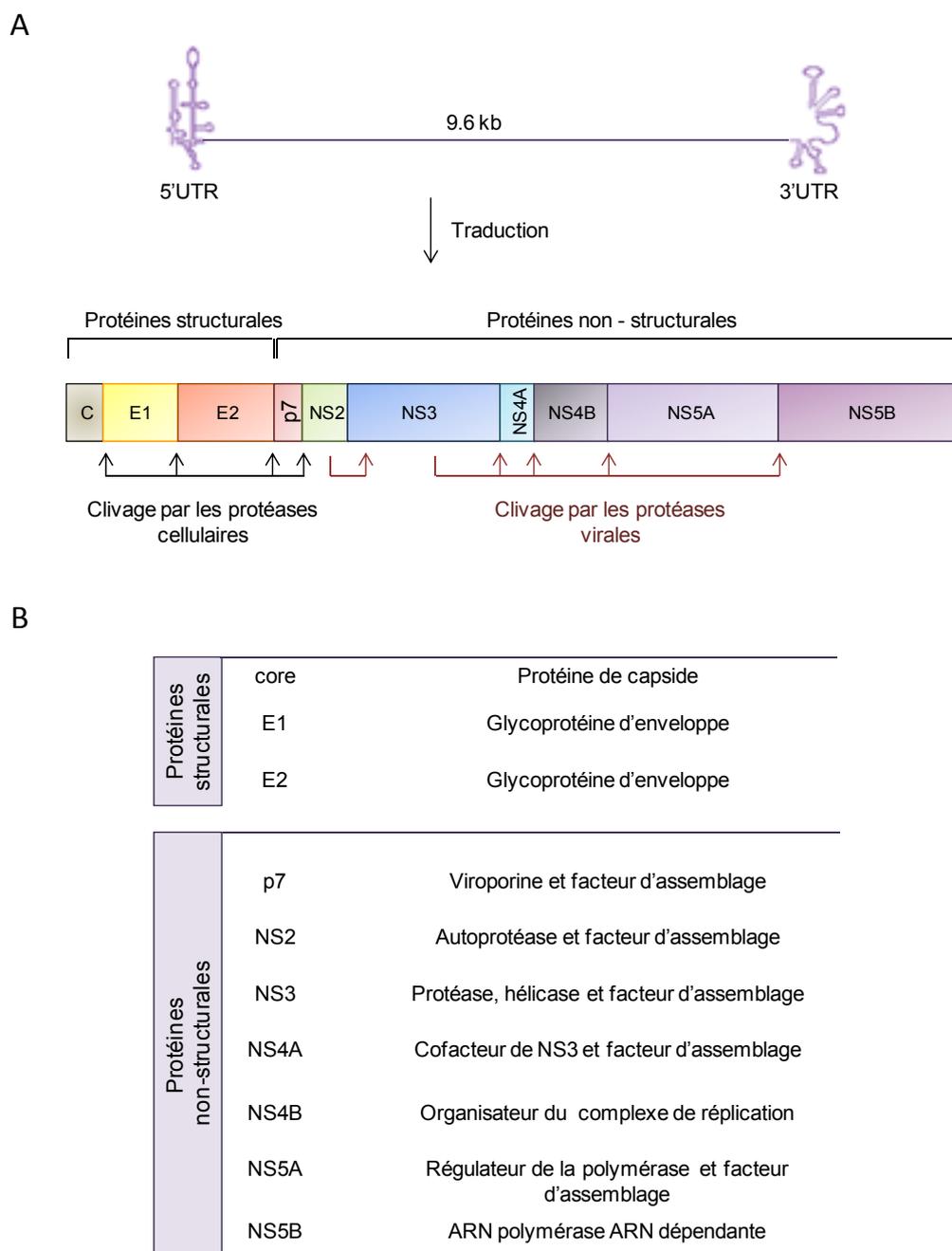


Figure 4. Le génome du HCV et ses protéines virales. (A) Le génome du HCV code pour une polyprotéine précurseur, qui est ensuite prise en charge par des protéases cellulaires et virales. Suite à ces clivages trois protéines structurales (core, E1, E2) et sept protéines non-structurales (p7, NS2-NS5B) sont obtenues. **(B)** Fonctions des protéines virales.

1. Les protéines structurales

La protéine core

La protéine core est une protéine mature de 21 kDa formant la nucléocapside virale. Après traduction et maturation au niveau du réticulum endoplasmique (RE), la protéine core est transportée vers les gouttelettes lipidiques (LD pour *lipid droplet*) à proximité du RE, lieu d'assemblage des particules virales (McLauchlan et al., 2002). La protéine core est composée de deux domaines principaux DI et DII. Le DI, situé en N-terminal, est impliqué dans l'attachement de l'ARN, l'homo-oligomérisation de core, ainsi que dans l'assemblage de la nucléocapside (Boulant et al., 2005). DI interagit également avec des facteurs de l'hôte, altérant des fonctions cellulaires favorisant l'infection par le HCV (Lin et al., 2006). Le DII, situé en C-terminal de core, permet des interactions avec l'interface phospholipidique des LD (Boulant et al., 2005). La protéine core peut aussi s'associer à NS5A et permettre le recrutement des protéines non structurales au niveau des LD. Cette association des protéines virales autour des LD est probablement un pré-requis pour l'assemblage du virus (Figure 5) (Masaki et al., 2008; Miyanari et al., 2007).

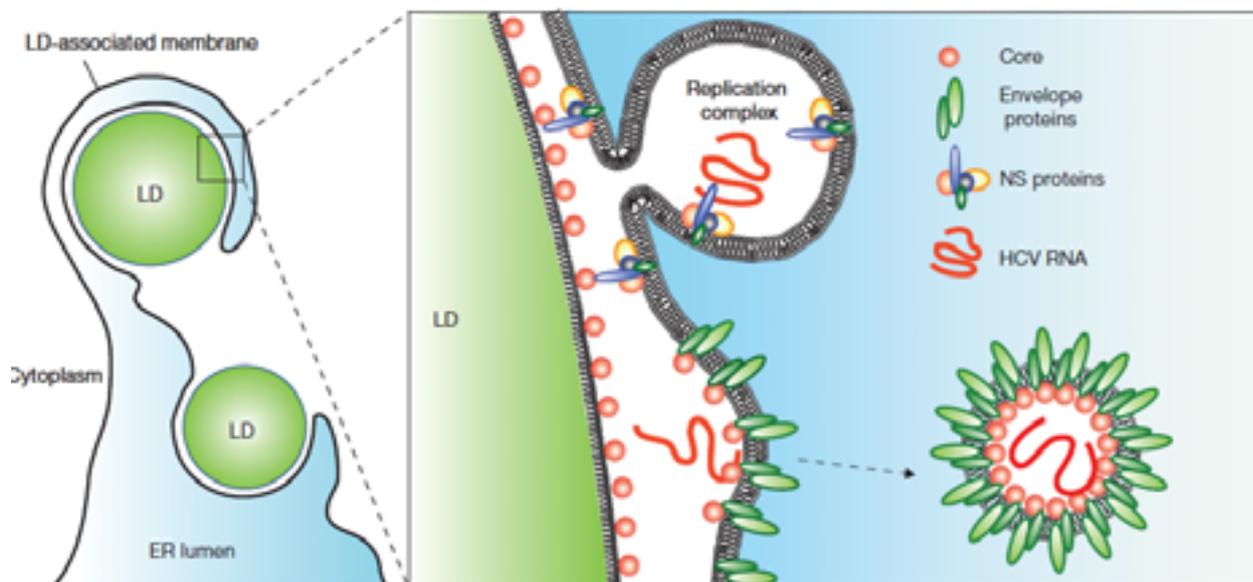


Figure 5. Rôle de la protéine core dans l'assemblage des particules virales. La protéine core est localisée principalement dans la simple membrane entourant les LD. Core recrute ensuite les protéines non structurales ainsi que les complexes de réplication au niveau de la membrane du RE associée aux LD. Les GP sont également localisées à proximité des LD. De part ces associations, l'assemblage des particules virales se déroule dans cet environnement. (Miyanari et al., 2007)

Les glycoprotéines d'enveloppe

Les GPs E1 (32kDa) et E2 (70kDa) sont des protéines transmembranaires de type I et jouent un rôle essentiel lors des premières étapes du cycle viral. Les domaines transmembranaires de E1 et E2 contribuent aux fonctions des protéines, notamment en permettant l'ancrage membranaire, la rétention dans RE ainsi que la formation des hétérodimères (Voisset and Dubuisson, 2004). La maturation et l'organisation tridimensionnelle de E1 et E2 est complexe et interdépendante, impliquant des protéines chaperonnes du RE, la formation de ponts disulfures ainsi que des N-glycosylations (Cocquerel et al., 2002 ; Helle et al., 2010; Vieyres et al., 2010 ; Voisset and Dubuisson, 2004).

Un modèle de l'organisation structurale d'E2 a été proposé par Krey et al. (Figure 6) (Krey et al., 2010). Ce modèle met en évidence la présence de trois domaines DI, DII et DIII. Le DI contient la région hypervariable 1 (HVR1 pour *hypervariable region 1*) ainsi que des déterminants de liaison au récepteur CD81. Le DII contient HVR2 et la région la plus conservée de ce domaine jouerait un rôle dans la fusion membranaire. Enfin, DIII contient également des résidus de liaison au CD81 et est connecté au domaine transmembranaire par une région flexible appelée *stem region*. Cette région serait impliquée dans la réorganisation des complexes glycoprotéiques lors de la fusion (Albecka et al., 2011). Les DII et DIII sont relativement non-structurés permettant d'adopter différentes conformations en fonction des différents partenaires tels que E1 et les différents récepteurs (Krey et al., 2010).

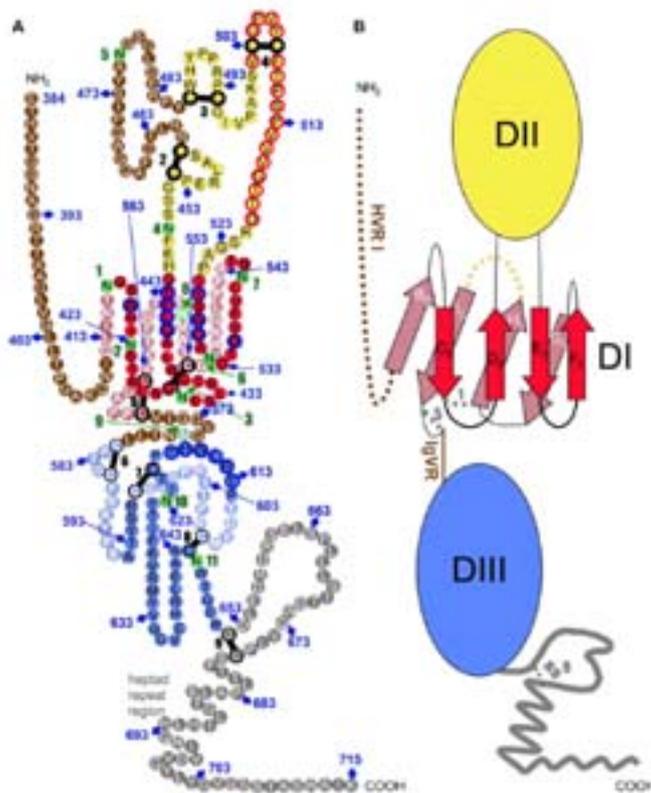


Figure 6. Organisation structurale de la glycoprotéine d'enveloppe E2. Séquence linéaire de E2 de la souche HCV H77. Les ponts disulfures et les sites de glycosylation sont respectivement représentés par des barres noires épaisses et des ronds verts. Les résidus impliqués dans la liaison au CD81 sont encerclés en bleu. Le DI de E2 est représenté en rouge/rose et le DII et DIII respectivement en jaune et en bleu. (Krey et al., 2010).

Les GPs E1 et E2 jouent plusieurs rôles à différentes étapes du cycle viral (entrée virale, fusion et assemblage) (Bartosch et al., 2003a). Pour cela, elles peuvent adopter plusieurs conformations afin d'être fonctionnelles au bon moment du cycle du HCV. Les GP interagissent directement avec différents facteurs d'attachement et d'entrée comme les héparanes sulfates (Barth et al., 2006b), la tétraspanine CD81 (Pileri et al., 1998), le SR-BI (Scarselli et al., 2002) et probablement claudine (CLDN) (Douam et al., 2013) et occludine (OCLN) (Liu et al., 2009). Elles sont également impliquées dans le processus de fusion membranaire nécessaire à la libération de la nucléocapside dans le cytoplasme, bien que cette étape du cycle viral ne soit pas entièrement comprise (Lavillette et al., 2006 ; Lavillette et al., 2007). Les GPs E1 et E2 sont les cibles principales des nAbs (Fournillier et al., 2001 ; Owsianka et al., 2008). Les domaines HVR1 et HVR2 de E2 sont hautement variables et immunogènes (Fafi-Kremer et al., 2012). Ces variations participent à l'échappement viral aux réponses immunitaires humorales (von Hahn et al., 2007).

Le peptide p7

La protéine p7 (7 kDa) est un petit peptide membranaire (Steinmann et al., 2007). Elle peut former des hexamères ou des heptamères et agir comme un canal cationique, la classant ainsi dans la famille des viroporines (Chandler et al., 2012 ; Nieva et al., 2012 ; OuYang et al., 2013). La protéine p7 est importante pour l'assemblage et la libération de particules infectieuses du HCV (Gentzsch et al., 2013; Steinmann et al., 2007).

2. Les protéines non-structurales

La protéine NS2

La protéine NS2 (21-23 kDa) est une protéase permettant le clivage de la jonction de NS2/NS3 (Lorenz et al., 2006). Ce clivage est indispensable à la libération de NS3 et à la réplication virale (Dentzer et al., 2009). La protéine NS2 est également requise pour la production de particules virales infectieuses (Dentzer et al., 2009). Enfin, NS2 interagit avec d'autres protéines structurales (GPs) et non structurales (p7, NS3), permettant le recrutement de ces protéines à proximité des LD (Popescu et al., 2011). NS2 joue ainsi un rôle central dans l'assemblage des particules virales (Boson et al., 2011 ; Jirasko et al., 2010 ; Stapleford and Lindenbach, 2011).

Le complexe NS3/NS4A

La protéine NS3 (70 kDa) est associée au cofacteur NS4A et possède deux activités enzymatiques : une activité hélicase et une activité protéase. L'activité hélicase joue un rôle essentiel dans la réplication virale ainsi que dans les étapes précoces de l'assemblage du HCV

(Murray et al., 2008). Le complexe protéase NS3/NS4A catalyse le clivage des jonctions de NS3/NS4A, NS4A/NS4B, NS4B/NS5A et NS5A/NS5B (Penin et al., 2004). Le complexe NS3/NS4A n'est pas seulement localisé à la membrane du RE ainsi que dans le complexe de réplication, mais peut également être retrouvé au niveau des mitochondries et des membranes associées aux mitochondries (Horner et al., 2011). Ces complexes NS3/NS4A auraient une action négative sur des éléments du système immunitaire inné, favorisant la persistance et la pathogénèse du HCV (Li et al., 2005). Deux DAAs ciblant ce complexe ont été approuvés pour le traitement de l'infection par le HCV génotype 1: le bocéprévir et le télaprévir. De nombreux autres inhibiteurs de ce complexe sont en cours de développement avec une action antivirale efficace sur plusieurs génotypes ainsi qu'une résistance supérieure à l'apparition de mutants (ex. le neceprévir) (Asselah and Marcellin, 2011; Poordad et al., 2011).

La protéine NS4B

La protéine NS4B (24kDa) joue un rôle crucial dans l'assemblage d'un complexe de réplication fonctionnel. NS4B induit la formation d'un réseau membranaire appelé *membraneous web*, formant une plateforme pour le complexe de réplication (Moradpour et al., 2003). Ce réseau est constitué de vésicules à simple membrane ou à double membrane. Tardivement au cours de l'infection, ces vésicules vont devenir multi-membranaires faisant probablement suite à un stress cellulaire. Les *membraneous web* dérivent du RE mais contiennent également des marqueurs des endosomes précoces et tardifs ainsi que des mitochondries et des LD (Romero-Brey et al., 2012). L'oligomérisation de NS4B est essentielle à la formation de ce réseau membranaire (Gouttenoire et al., 2010; Yu et al., 2006). De nouvelles thérapies ciblant NS4B sont également en développement tel que le PTC725. Cette molécule est bien tolérée chez l'animal avec peu d'interaction médicamenteuse et capable d'inhiber efficacement la réplication de réplicons HCV à de faibles concentrations. De plus le traitement combiné du PTC725 avec le bocéprévir possède un effet synergique sur l'inhibition de l'apparition de mutations de résistance.(Gu et al., 2013 ; Rai and Deval, 2011).

La protéine NS5A

La protéine NS5A (49 kDa) est une protéine impliquée dans les étapes de réplication et d'assemblage. Récemment, il a été démontré que NS5A participerait également à la formation des *membraneous web* (Romero-Brey et al., 2012). En effet, NS4B induirait les vésicules à simple membrane alors que NS5B induirait les vésicules à double membrane (Romero-Brey et al., 2012). NS5A est composée de trois domaines DI, DII et DIII. Le DI permet la liaison de NS5A à l'ARN viral et la réplication du virus (Tellinghuisen et al., 2005) alors que le domaine DIII est essentiel à l'assemblage des particules virales (Tellinghuisen et al., 2008) ; (Appel et al., 2008). L'association de NS5A avec l'apolipoprotéine E (apoE) est nécessaire à cette étape

d'assemblage (Benga et al., 2010 ; Cun et al., 2010) . NS5A peut se lier aux LD et interagir avec la protéine core. Le niveau de phosphorylation de NS5A module la réplication virale en régulant les interactions avec les différents facteurs de réplication ou d'assemblage (Bartenschlager et al., 2011). NS5A peut également interagir avec de nombreuses protéines virales et cellulaires comme la cyclophiline A et affecter les réponses immunitaires de l'hôte (Ciesek et al., 2009). Des DAAs ciblant NS5A (comme le daclatasvir) ont été développés avec des actions antivirales efficaces à faible dose (Pawlotsky, 2013).

La protéine NS5B

La protéine NS5B (66 kDa) est l'ARN polymérase ARN dépendante permettant la synthèse de nouveaux brins d'ARN du HCV (Grakoui et al., 1993). De part l'absence d'activité correctrice, elle est responsable de l'importante diversité du HCV. L'importance de cette protéine pour l'étape de réplication fait de NS5B une cible majeure dans le développement d'antiviraux (Asselah and Marcellin, 2011). Récemment, Gouklani et al. ont identifié une mutation dans NS5B qui affecte l'infectiosité du HCV mais n'a pas d'effet sur la réplication virale. Cette étude suggère un rôle additionnel de NS5B dans la morphogénèse des particules virales (Gouklani et al., 2012).

III. Hétérogénéité du HCV

La difficulté du contrôle de l'infection par le HCV est en grande partie due à la remarquable diversité virale. Cette variabilité du HCV est liée à son fort taux de réplication et à l'absence d'activité exonucléasique correctrice de l'ARN polymérase. Le taux de mutations du génome du HCV est estimé à $10^{-3}/10^{-4}$ substitutions par site. Cette variabilité s'exprime au niveau du génome par l'existence d'au moins sept génotypes majeurs et plusieurs sous-types du HCV. Les génotypes sont définis par une divergence minimale de 30% de leurs séquences nucléotidiques alors que les sous-types ont une divergence de seulement 20% (Simmonds, 2004).

Bien que présentant des caractéristiques relativement similaires de persistance, de dynamique de transmission et de développement de la maladie, les génotypes du HCV peuvent se distinguer par leur évolution séparée dans différentes régions géographiques. Le génotype 1 est le plus décrit en Amérique, en Europe ainsi qu'au Japon, suivis des génotypes 3 et 2. Les génotypes 3 et 6 sont répandus en Asie du Sud et du Sud-Est. Les génotypes 4 et 5 sont couramment retrouvés en Afrique mais se propagent actuellement en Europe (Cornberg et al., 2011 ; Khattab et al., 2011; Sievert et al., 2011). Enfin le génotype 7 est retrouvé chez des patients en Afrique mais il reste rare et d'importance clinique mineure. De manière intéressante, les différents sous-types sont majoritairement identifiés dans des groupes à risques distincts, tels qu'une prédominance du génotype 3a dans les populations toxicomanes en Europe, et une prédominance des génotypes 1b, 2a et 2b dans les populations plus âgées d'Europe et d'Asie

(contamination de produits de transfusions). La diversité du HCV a un impact clinique majeur car les géotypes répondent différemment aux traitements antiviraux (Lee et al., 2012).

En outre, chez les patients, le virus circule sous la forme d'une population de variants viraux différents mais génétiquement proches, appelée « quasi-espèce » (Martell et al., 1992). La présence de cette quasi-espèce contribue grandement à l'échappement viral au système immunitaire de l'hôte (von Hahn et al., 2007).

Les modèles d'étude en laboratoire

I. Les modèles *in vitro*

Bien que découvert dans les années 1990, les recherches sur le HCV ont été grandement limitées par l'absence de modèle permettant une étude rigoureuse du cycle viral. Les glycoprotéines des virus enveloppés définissent grandement les interactions entre le virus et la cellule hôte. Ainsi, la production d'une forme tronquée soluble de la GP E2 du HCV (sE2) a été un premier outil développé pour l'étude de l'entrée du HCV. L'utilisation du sE2 a permis d'affirmer le rôle essentiel des récepteurs CD81 et SR-BI pour l'entrée virale (Flint et al., 1999 ; Pileri et al., 1998 ; Scarselli et al., 2002). Cependant E1 et E2 forment un hétérodimère complexe à la surface des virions et les protéines sE1 et sE2 ne reflètent pas la conformation réelle du complexe glycoprotéique, limitant leur utilisation.

Afin de se rapprocher d'un modèle plus représentatif, des HCV-like particles (HCV-LP) ont été développées (Baumert et al., 1998). Ces HCV-LP sont générées par auto-assemblage des protéines structurales et sont produites dans des cellules d'insectes à partir d'un baculovirus recombinant contenant l'ADNc des protéines structurales du HCV (Baumert et al., 1998 ; Triyatni et al., 2002). Ce modèle a permis de caractériser l'attachement du HCV aux cellules hôtes (Baumert et al., 1998 ; Triyatni et al., 2002). L'immunisation de chimpanzés par les HCV-LP peut également induire des réponses immunitaires spécifiques capables de protéger l'animal d'une infection persistante (Elmowalid et al., 2007). Ce modèle limite cependant l'étude du virus à la seule étape d'entrée dans les hépatocytes et nécessite des techniques immunologiques pour la détection de l'attachement ou de l'entrée des HCV-LP.

1. Les réplicons

L'équipe du Pr Bartenschlager a mis au point le premier système permettant l'étude de la réplication virale dans les cellules hépatocytaires: les réplicons (Lohmann et al., 1999). Les premiers réplicons subgénomiques étaient constitués d'une séquence génomique consensus, obtenue chez un patient infecté par un génotype 1b (con1), après TH. Ces réplicons contiennent le 5'UTR du HCV en amont d'un gène de résistance, suivit de l'IRES du virus de l'encéphalomyocardite (permettant la traduction des protéines non structurales) et se terminent par le 3'UTR du HCV (Figure 7A). Après transfection de l'ARN dans des cellules permissives, les cellules répliquant les réplicons du HCV vont être sélectionnées par antibiotique (Lohmann et al., 1999). La lignée hépatocytaire Huh7 ainsi que des clones

cellulaires encore plus adaptés (Huh7.5 et Huh7.5.1) représentent les lignées les plus permissives au HCV et sont ainsi couramment utilisées dans ces études.

Par la suite, des réplicons subgénomiques de différents génotypes du HCV ont été établis (Bartenschlager, 2006; Blight et al., 2003 ; Kato et al., 2003). Plusieurs équipes ont observé au cours de la sélection, l'apparition de plusieurs mutations, notamment au niveau des protéines NS3, NS4B et NS5A, qui améliorent les capacités de réplication des réplicons (Blight et al., 2003 ; Grobler et al., 2003; Krieger et al., 2001). Ce système a permis de tester l'activité antivirale de nombreuses molécules (notamment des DAA).

2. Les pseudoparticules rétrovirales

La mise au point des pseudoparticules rétrovirales (HCVpp) (Bartosch et al., 2003a ; Hsu et al., 2003) constitue le premier système robuste et flexible qui a permis l'étude des fonctions virales dépendantes des GPs E1-E2, telles que l'entrée et la neutralisation par les anticorps (Law et al., 2008 ; Meunier et al., 2005 ; Owsianka et al., 2005 ; Pestka et al., 2007 ; Tarr et al., 2007 ; von Hahn et al., 2007). Les HCVpp sont constituées des GPs E1 et E2 fonctionnelles, insérées dans une particule rétrovirale (Figure 7B). Ces virus chimères sont obtenus par transfection de cellules HEK 293T. Ces cellules sont dérivées de cellules embryonnaires humaines rénales et transformées par l'antigène T du virus simien 40 (Ali and DeCaprio, 2001 ; Graham et al., 1977). Afin de produire des HCVpp, les HEK 293T sont transfectées avec trois vecteurs d'expression. Le premier vecteur (gag-pol) exprime les protéines de capsid d'un rétrovirus, le virus de la leucémie murine ou le HIV. Le second vecteur exprime les GPs E1-E2 natives des différents génotypes du HCV. Enfin, le troisième vecteur exprime un génome rétroviral défectif comportant uniquement une séquence terminale longue et un signal d'encapsidation et code pour un gène marqueur de transfert (gènes rapporteurs : *green fluorescent protein* [GFP], luciférase ou bêta-galactosidase) (Bartosch et al., 2003a). Les HCVpp sont considérées comme un outil de référence pour l'étude des GPs E1-E2 et de l'entrée virale dans des lignées hépatocytaires ainsi que dans les hépatocytes primaires humains (PHH). Cependant, les HCVpp sont produites dans des lignées non hépatocytaires et l'assemblage des protéines virales s'effectue dans les compartiments post-golgi et/ou à la membrane plasmique comme les rétrovirus (Bartenschlager et al., 2011 ; Gastaminza et al., 2006; Sandrin et al., 2005). Les GPs E1E2 des HCVpp ont ainsi une conformation différente de celle des virus natifs avec notamment la formation d'hétérodimères non-covalents (Op De Beeck et al., 2004; Vieyres et al., 2010). De plus, les HCVpp ne sont pas associées aux lipoprotéines limitant l'étude des récepteurs liés aux lipides ainsi que les autres étapes du cycle viral (Bartosch et al., 2003a).

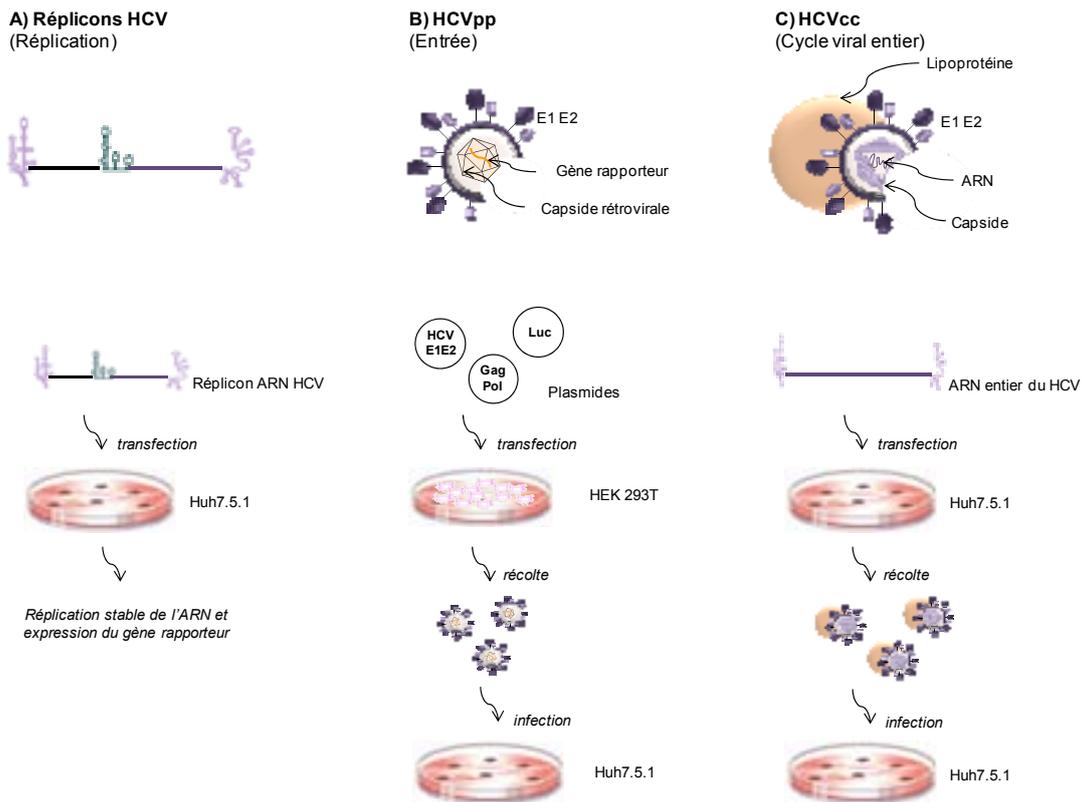


Figure 7. Les modèles d'études principaux du HCV. A) La réplique virale peut être quantifiée en utilisant le modèle des réplicons. Ces ARNs auto-répliquatifs comportent un gène de sélection remplaçant la région codant de core à NS2 en amont d'un second IRES du EMCV permettant la traduction des protéines NS3 à NS5B. **B)** Les pseudoparticules virales (HCVpp) sont utilisées afin d'étudier les mécanismes d'entrée du virus dans les hépatocytes. Les HCVpp sont produites par transfection des cellules HEK 293T avec trois plasmides codant pour i) les gènes gag-pol d'un rétrovirus, ii) les GPs E1 et E2 du HCV et iii) un gène marqueur de transfert. **C)** Les HCVcc permettent une étude complète du cycle du HCV. L'ARN codant pour le génome entier est transfecté dans les cellules hépatocytaires permissives menant à la traduction et à la réplique virale pour produire de nouvelles particules virales infectieuses. *Figure inspirée de (Bartenschlager R. (Ed), 2013)*

3. Les virus infectieux produits en culture cellulaire

L'avancée majeure des études du HCV a été la mise au point d'un modèle de virus infectieux produit en culture cellulaire (HCVcc) (Lindenbach et al., 2005 ; Pietschmann et al., 2006; Wakita et al., 2005). Contrairement aux HCVpp, les HCVcc sont produits à partir d'un génome entier et permettent ainsi l'étude intégrale du cycle viral, de l'entrée à la libération des virions nouvellement synthétisés (Figure 7C). Le modèle HCVcc est basé sur la transfection cellulaire d'ARN d'un variant de génotype 2a, dénommé JFH1 identifié chez un patient atteint d'hépatite fulminante. JFH1 possède des caractéristiques uniques permettant la production de particules infectieuses à la fois dans les lignées cellulaires et en modèle animal (Lindenbach et al., 2005 ; Wakita et al., 2005 ; Zhong et al., 2005). La découverte de ce variant a permis l'étude de toutes les étapes du cycle du HCV. D'autres clones (H77S ; HCV génotype 1a, NC1 ; HCV génotype 1b) ont été développés (Date et al., 2012; Yi et al.,

2006). Ces clones nécessitent néanmoins des mutations adaptatives et restent moins efficaces que JFH1 en termes de réplication et de production virale (Bartenschlager R. (Ed), 2013).

En l'absence de gène rapporteur, l'étude de ces virus est réalisée en utilisant des méthodes d'immunomarquage des protéines virales et de détermination de l'infectiosité par comptage des cellules infectées (FFU pour *focus-forming unit*) ou bien par technique de dilution limite (TCID₅₀ pour *50% tissu culture infective dose*) (Lindenbach et al., 2005 ; Wakita et al., 2005). Bien qu'efficaces, ces méthodes requièrent du temps pour la lecture des résultats. Ainsi, des virus intégrant un gène rapporteur (généralement la luciférase mais également la GFP ou RFP), ont été générés afin de faciliter l'étude du cycle viral (Koutsoudakis et al., 2006).

La construction de chimères JFH1 est également un outil très utile. En effet, il est possible de réaliser des HCVcc avec une combinaison des protéines structurales des différents génotypes et des protéines non-structurales du JFH1 créant des virus chimères intra- et inter-génotypiques (Fofana et al., 2012; Lindenbach et al., 2005 ; Pietschmann et al., 2006). Plus récemment des virus chimères avec des séquences partielles des protéines non-structurales de différents génotypes ont été développés. Ces virus permettent notamment l'étude des mutations de résistance aux DAAs (Gottwein et al., 2011 ; Scheel et al., 2011).

Contrairement aux HCVpp, les HCVcc produits sont associés aux lipoprotéines et mûrent dans les voies de sécrétions (Gastaminza et al., 2006). Ces associations sont essentielles à la conformation correcte des GPs et à l'exposition des épitopes viraux aux nAbs. Cependant, contrairement aux LVP les HCVcc ne contiennent pas ou peu d'apoB étant donné qu'elles sont produites à partir de la lignée cellulaire Huh7 chez laquelle la sécrétion de VLDL est inefficace (Bartenschlager et al., 2011). Bien que ne reflétant pas exactement le virus natif, le modèle HCVcc se rapproche plus des virus dérivés de patients que les autres modèles utilisés jusqu'à présent, et constitue de ce fait un outil pertinent dans le développement d'un vaccin.

II. Les modèles *in vivo*

Les modèles *in vitro* ont abouti à des avancées majeures dans la compréhension de la biologie de l'infection par le HCV et continuent aujourd'hui à être très largement utilisés. Néanmoins, le développement d'un modèle animal efficace est essentiel pour comprendre la pathogenèse du HCV et développer un vaccin efficace (Murray and Rice, 2011). Le tropisme limité du HCV complique l'obtention d'un bon modèle *in vivo*. A ce jour le chimpanzé constitue le modèle le plus pertinent d'étude du HCV (Bukh, 2004). Etonnamment, et malgré

d'importantes homologies de séquences (notamment des facteurs d'entrée du HCV), les autres primates ne sont pas infectés par le virus. Un autre mammifère, plus petit et provenant d'Asie du sud, est également permissif au HCV: le *Tupaia belangeri*. L'entrée virale est efficace dans ce modèle, et certains animaux développent des signes pathologiques comme des stéatoses, fibroses ou cirrhoses dans les trois ans suivant l'infection, bien que les virémies restent relativement basses (Amako et al., 2010; Zhao et al., 2002). Les souris ne sont pas naturellement infectées par le HCV. Grâce à leur facilité de manipulation en laboratoire, des souris transgéniques permissives au virus ont été développées. Ces souris représentent un outil précieux pour l'étude de molécules antivirales et une alternative à l'utilisation des chimpanzés.

1. Le modèle primate

Avec 98% d'identité génétique avec l'homme, les chimpanzés sont les seuls primates pouvant être infectés par le HCV. Une semaine après infection, les chimpanzés présentent une virémie de 10^5 à 10^7 copies génomique/mL ainsi que des réactions immunitaires contre le virus (Cooper et al., 1999 ; Thimme et al., 2002). Ils constituent ainsi le meilleur modèle pour l'étude des réponses immunitaires innées et adaptatives contre le HCV (Bukh, 2012). Bien que les chimpanzés ne développent que rarement des fibroses, cirrhoses ou HCC, ils ont permis de nombreuses avancées dans la compréhension de l'histoire naturelle de l'infection par le HCV ainsi que dans l'étude des réponses immunitaires protectives lors de réinfections (Farci et al., 1992) . Ce modèle est également un outil précieux pour les essais thérapeutiques et les vaccins candidats contre le HCV (Barth et al., 2011 ; Bukh, 2004; Choo et al., 1994 ; Farci et al., 1994 ; Folgori et al., 2006 ; Meunier et al., 2011 ; Olsen et al., 2011). Cependant les coûts engendrés ainsi que les problèmes d'éthique limitent l'utilisation excessive de ces animaux pour des études scientifiques. Il est ainsi essentiel aujourd'hui de développer de nouveaux modèles animaux.

2. Les modèles murins

Naturellement, les souris ne sont pas infectables par le HCV à cause des variations génétiques de certains récepteurs essentiels à l'entrée virale (Flint et al., 2006 ; Michta et al., 2010 ; Ploss et al., 2009). Cependant, la technologie de transgénèse a permis de développer différents modèles pour l'étude de l'infection à HCV. Le modèle le plus couramment utilisé est le modèle souris uPA-SCID (pour *urokinase plasminogen activator - severe combined immunodeficiency disorder*). Ces souris transgéniques immunodéficientes sont caractérisées par une dégénérescence hépatocytaire due à la surexpression du gène uPA sous contrôle du promoteur de l'albumine (Sandgren et al., 1991). Cette dégénérescence hépatique est

exploitée afin de reconstituer un foie avec une xéno greffe de PHH (Mercer et al., 2001). Ce modèle est largement utilisé afin d'évaluer les capacités de neutralisation et de prévention de l'infection par des anticorps (Lacek et al., 2012 ; Law et al., 2008 ; Meuleman et al., 2012 ; Vanwolleghem et al., 2008) ainsi que pour tester des thérapies (Dorner et al., 2011 ; Kneteman et al., 2009; Meuleman et al., 2011 ; Meuleman et al., 2008). Malheureusement, l'utilisation des souris uPA-SCID est grandement limitée par des difficultés techniques ainsi qu'un taux de mortalité élevé des animaux. De plus, l'absence de réponses immunitaires adaptatives empêche leur utilisation pour le développement d'un vaccin (Bukh, 2012). Afin de contourner ces deux problèmes majeurs, d'autres modèles murins ont été développés. Chez les souris FRG (pour Fah^{-/-}, Rag2^{-/-}, Il2rg^{-/-}), la dégénérescence hépatocytaire peut être programmée afin de permettre aux souris de devenir adultes avant la greffe de PHH et ainsi favoriser leur survie (Bissig et al., 2007 ; Bissig et al., 2010 ; de Jong et al., 2010). Récemment, Washburn et al. ont également développé un modèle de souris immunocompétentes (Bukh, 2012 ; Dorner et al., 2012; Washburn et al., 2011). Un système immunitaire ainsi qu'un foie humain ont été partiellement reconstitués par la greffe à la fois de cellules souches hématopoïétiques et de cellules progénitrices hépatocytaires humaines (souris AFC8-huHSC/hep) (Washburn et al., 2011). Ces souris sont susceptibles de générer une réponse immunitaire cellulaire spécifique contre le HCV ainsi que de développer des lésions hépatiques de type hépatite et fibrose (Bility et al., 2012; Washburn et al., 2011). Cependant, la réplication virale apparaît comme faible et peu robuste. Dorner et al. ont également développé un modèle de souris immunocompétentes humanisées par injection intraveineuse d'adénovirus recombinants, codant pour les 4 principaux facteurs humains nécessaires à l'entrée virale (Dorner et al., 2012). Ces souris sont génétiquement modifiées afin de monitorer l'entrée virale. Ce système permet l'entrée du HCV dans les hépatocytes murins *in vivo* mais pas la réplication ni la production de particules virales infectieuses. Récemment Dorner et al. sont parvenus à reproduire le cycle complet du HCV dans des souris transgéniques, exprimant les 4 principaux facteurs d'entrée humains du HCV et déficientes pour certains gènes de l'immunité innée, avec notamment la production de nouvelles particules infectieuses (Dorner et al., 2013). Ces souris étant immunocompétentes - hormis le déficit dans les réponses immunitaires innées, elles peuvent être utilisées pour des expériences de neutralisation et d'immunisation. Elles représentent ainsi un outil utile pour l'évaluation de stratégies d'immunisations passives et le développement d'un vaccin (Bukh, 2012; Dorner et al., 2012).

Interactions HCV-cellule hôte : les acteurs d'une histoire complexe

La compréhension des interactions d'un virus avec son hôte est un facteur clé pour le développement de stratégies antivirales. Ces dix dernières années, les études sur le HCV se sont multipliées et ont abouti à une compréhension plus détaillée des étapes du cycle viral ainsi que des facteurs viraux et cellulaires essentiels à l'infection. Ceci a permis le développement de nouvelles cibles thérapeutiques et de nouvelles molécules antivirales efficaces.

I. Le cycle viral

Le HCV utilise un grand nombre de facteurs viraux et cellulaires afin d'infecter et de se répliquer efficacement dans les hépatocytes. La figure 8 schématise les étapes principales du cycle viral.

Les premières étapes: les facteurs d'attachement et d'entrée du HCV

Chez les patients infectés, le HCV circule dans le sang en association avec des lipoprotéines riches en triglycérides (TRL pour *triglycerides rich lipoproteins*). L'entrée du HCV dans les hépatocytes est un processus séquentiel complexe faisant intervenir à la fois les GPs E1 et E2 du HCV, les composants des lipoprotéines et différents facteurs cellulaires. Ces facteurs sont donc des éléments clés du tropisme hépatocytaire du HCV (Dubuisson et al., 2008 ; von Hahn and Rice, 2008). Les facteurs d'attachement peuvent être définis comme les premiers acteurs interagissant avec la LVP afin d'amener celle-ci à la surface des hépatocytes. Ces interactions sont relativement aspécifiques du virus bien que des interactions directes entre les GP et certains facteurs d'attachement du HCV aient également été démontrées. Cette étape d'attachement permet ensuite au virus d'interagir de manière plus spécifique avec des facteurs d'entrée hépatocytaires.

i. Les facteurs d'attachement

L'attachement du virus aux hépatocytes constitue la première étape essentielle au cycle du HCV. Plusieurs facteurs cellulaires non hépatocytaires ont été identifiés telles que les lectines de type C présentes à la surface des cellules dendritiques (DC-SIGN) ainsi qu'à la surface des cellules endothéliales du foie (L-SIGN) (Gardner et al., 2003 ; Lozach et al., 2004 ; Lozach et al., 2003 ; Pohlmann et al., 2003). Les lectines sont capables de reconnaître des motifs moléculaires associés aux pathogènes. Au cours de l'infection par le HCV, elles interagiraient avec la protéine E2 capturant le virus dans le foie et favorisant son transfert vers les hépatocytes (Cormier et al., 2004; Lozach et al., 2004). Plusieurs études basées sur les capacités de liaison des particules

virales, ont également identifié les protéoglycanes à héparanes sulfates (HSPG) (Barth et al., 2003), le récepteur aux lipides de faible densité (LDL-R pour *low density lipoprotein-receptor*) (Agnello et al., 1999 ; Monazahian et al., 1999) ainsi que le SR-BI (Bartosch et al., 2003b ; Dao Thi et al., 2012; Dreux et al., 2009 ; Maillard et al., 2006 ; Scarselli et al., 2002), comme des facteurs hépatocytaires principaux participant à l'attachement du HCV à ces cellules.

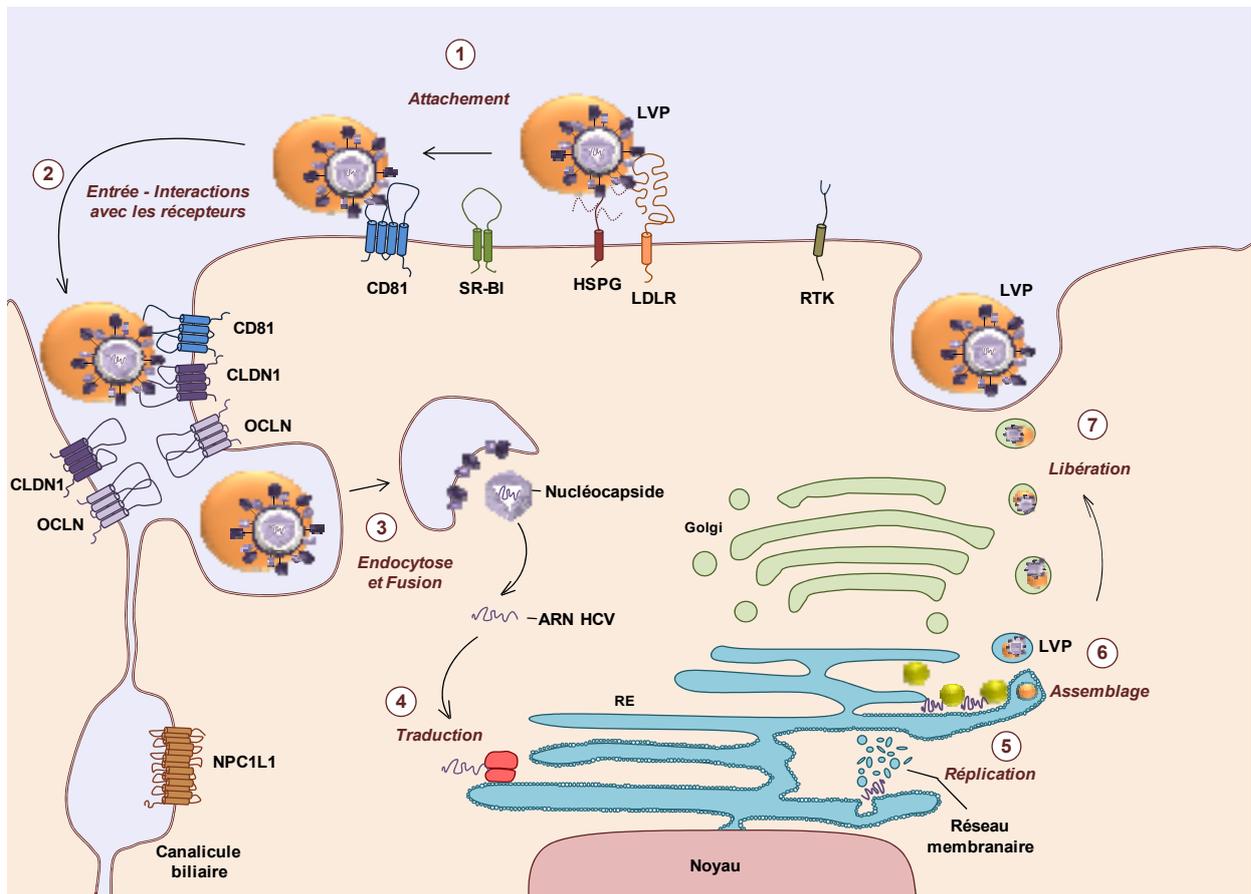


Figure 8. Le cycle viral du HCV. 1, Engagement initial de la LVP avec les facteurs d'attachement. 2, Interaction avec les différents récepteurs et migration du complexe CD81-CLDN1. 3, Endocytose de la particule virale et fusion membranaire dépendante du pH libérant la nucléocapside dans le cytoplasme. 4, Dissociation de la nucléocapside et traduction de l'ARN libéré en une polyprotéine prise en charge par des protéases cellulaires et virales. 5, Réplication du génome viral au niveau d'un réseau membranaire dérivé du RE (*membraneous web*). 6, Assemblage des particules virales au niveau des LD et du RE, couplé à la voie de formation des VLDL. 7, Libération des LVP.

HSPG : protéoglycanes à héparanes sulfates. *LD* : gouttelettes lipidiques. *LDLR* : récepteur des lipides de faible densité. *LVP* : lipovirionparticule. *RE* : réticulum endoplasmique. *RTK* : récepteurs tyrosine kinase. *VLDL* : lipides de très faible densité.

Les héparanes sulfates (HS) sont des polysaccharides localisés à la surface des cellules de mammifères ainsi que dans la matrice extracellulaire. Ils varient dans leur composition et leur quantité en fonction des espèces et des types cellulaires. Les HSPG sont constitués de chaînes d'HS liées à un corps protéique, et jouent de multiples rôles notamment dans la régulation de la

croissance cellulaire, ainsi que dans les processus de différenciation et d'adhésion cellulaire. Plus précisément, dans les hépatocytes, ils reliraient la matrice extracellulaire au cytosquelette intracellulaire (Rabenstein, 2002). Il a été récemment démontré que les HSPG des hépatocytes (et plus particulièrement syndecan-1) joueraient un rôle majeur dans la récupération des TRLs par le foie par liaison avec les apolipoprotéines (Deng et al., 2012 ; Gonzales et al., 2013 ; Stanford et al., 2009). Les HSPG sont utilisés comme facteurs d'attachement par plusieurs autres virus tels que le virus de la dengue (Hilgard and Stockert, 2000). L'étude de Barth *et al.* a été la première à décrire les capacités de liaison d'E2 aux HSPG. L'élimination des HS à la surface cellulaire par un traitement avec de l'héparinase, affecte les capacités de liaison des HCV-LP aux cellules confirmant le rôle des HSPG dans l'attachement initial du virus (Barth et al., 2003). Plus tard, les progrès obtenus dans les modèles d'études *in vitro* ont permis de confirmer ces résultats en utilisant les HCVpp et HCVcc (Barth et al., 2006b ; Koutsoudakis et al., 2006; Morikawa et al., 2007). Jiang et al. ont également décrit que des mutations ponctuelles dans le domaine de liaison aux récepteurs d'apoE diminuent l'infection par le HCV et affectent les capacités de liaison d'apoE à l'héparine (Jiang et al., 2012). Ces résultats suggèrent que les lipoprotéines associées au virus faciliteraient l'attachement viral aux HSPG notamment via apoE. Shi et al. ont récemment cherché à déterminer quel HSPG était spécifiquement impliqué à cette étape du cycle viral. Ils ont démontré que syndecan-1 serait un récepteur majeur permettant l'attachement des particules virales aux hépatocytes (Shi et al., 2013 ; Stanford et al., 2009).

Le LDL-R est une glycoprotéine présente à la surface cellulaire de toutes les cellules nucléées et est regroupée dans des puits recouverts de clathrine. Ce récepteur joue un rôle physiologique dans l'homéostasie du cholestérol. Un des ligands du LDL-R est la lipoprotéine de faible densité (LDL pour *low density lipoprotein*) qui contient la majeure partie du cholestérol humain ainsi que l'apolipoprotéine B (apoB) (Brown and Goldstein, 1986). Le LDL-R lie également fortement les lipides de très faible densité (VLDL pour *very low density lipoprotein*) qui contiennent une importante quantité d'apoE. La liaison de ces ligands au récepteur mène à l'internalisation des complexes par endocytose. La diminution du pH permet de dissocier le ligand du récepteur qui sera ensuite recyclé à la surface cellulaire (Brown and Goldstein, 1986). De part l'association des particules virales aux lipoprotéines (formant les LVP) et plus particulièrement aux VLDL, le LDL-R a également été identifié comme un facteur d'attachement du HCV (Agnello et al., 1999 ; Molina et al., 2007 ; Owen et al., 2009). Plus précisément, c'est l'apoE présente à la surface des LVP qui faciliterait l'attachement viral en interagissant avec le LDL-R. Cependant, une étude a récemment suggéré que le LDL-R jouerait un rôle mineur dans l'entrée du HCV et aboutirait au contraire à une internalisation non-productive du virus. Le LDL-R aurait tout de même un rôle essentiel dans le cycle viral en optimisant la réplication virale via sa fonction physiologique dans le métabolisme lipidique (Albecka et al., 2012).

Le SR-BI est une protéine de surface membranaire, majoritairement exprimée dans le foie, les tissus stéroïdogènes ainsi qu'à la surface des cellules dendritiques dérivées de monocytes (Scarselli et al., 2002). SR-BI permet un flux bidirectionnel du cholestérol entre les lipides de haute densité (HDL pour *high density lipoprotein*) et les hépatocytes via la membrane plasmique (Krieger, 2001). SR-BI joue probablement de multiples rôles dans le cycle du HCV. De part ses fonctions de récepteur des lipoprotéines et ses capacités de liaison à E2, il participe à l'attachement de la LVP à la surface des hépatocytes ainsi qu'à l'entrée virale (Barth et al., 2005 ; Bartosch et al., 2003b ; Catanese et al. ; Dreux et al., 2009; Maillard et al., 2006 ; Scarselli et al., 2002 ; Zeisel et al., 2007b). Une étude récente a également démontré que SR-BI jouerait un rôle supplémentaire dans le cycle viral afin de stimuler l'infection par le HCV. Cette fonction est dépendante de E2 et de ses capacités de transfert lipidique (Dao Thi et al., 2012). SR-BI joue ainsi un rôle multifactoriel au cours des premières étapes du cycle viral du HCV, basé en partie sur ses fonctionnalités physiologiques.

ii. Les facteurs d'entrée

La première molécule identifiée comme récepteur du HCV et jouant un rôle essentiel pour l'entrée virale a été la molécule CD81 (Pileri et al., 1998). Le CD81 appartient à la famille conservée des tétraspanines et possède quatre domaines transmembranaires avec deux boucles extracellulaires EC1 et EC2. Cette glycoprotéine, exprimée à la surface de nombreux types cellulaires, peut former des complexes avec une variété d'autres récepteurs présents dans des domaines enrichis en tétraspanines (ex. les intégrines) (Farquhar et al., 2011; Yanez-Mo et al., 2009). Le CD81 permet la transduction de certains signaux impliqués dans la régulation du développement cellulaire comme la migration, la prolifération et l'adhésion (Levy et al., 1998; Quast et al., 2011).

Dans les années 2000, Pileri et al. ont démontré que la GPs E2 du HCV se lie à la grande boucle extracellulaire de CD81 (EC2), via plusieurs résidus répartis sur la séquence d'E2 (Krey et al., 2010). L'interaction d'E2 avec CD81 est essentielle à l'entrée virale et peut être bloquée par des anticorps (Fofana et al., 2013a ; Keck et al., 2008 ; Owsianka et al., 2008). Le récepteur CD81 serait également nécessaire à la réplication virale (Zhang et al., 2010). CD81 peut interagir directement avec du sE2 (Pileri et al., 1998) et avec la protéine de jonction claudine 1 (CLDN1) (Harris et al., 2008). Il a été décrit que l'interaction de E2 et CD81 peut être modulée par des facteurs cellulaires appartenant à la famille des immunoglobulines : EWI-1 et EWI-2. Un produit de clivage de EWI-2 (appelé EWI-2wint) aurait une action inhibitrice de l'entrée du HCV en bloquant les interactions de CD81 avec E2. EWI-2wint est exprimée dans différents types cellulaires mais pas dans les hépatocytes ce qui pourrait expliquer en partie le tropisme du HCV pour ces cellules (Rocha-Perugini et al., 2008).

CD81 ne possède pas de motif d'internalisation couramment retrouvé en C-terminal chez les tétraspanines. Ceci laisse à penser que CD81 ne jouerait pas de rôle dans l'endocytose virale. Cependant il a été récemment démontré que des anticorps anti-CD81 pouvaient inhiber le virus à une étape ultérieure à l'internalisation (Farquhar et al., 2012). En effet, la fixation d'anticorps ou de particules virales au CD81, favorise l'endocytose du récepteur par une voie dépendante de la clathrine et de la dynamine. Ceci suggère que l'engagement de CD81 avec le HCV peut aboutir à son endocytose et que le CD81 endosomal aurait également un rôle dans l'infection virale (Farquhar et al., 2012). Enfin, la dynamique du récepteur à la surface cellulaire est également essentielle. Plus précisément, l'engagement du CD81 avec le HCV active des GTPases ainsi que la voie de signalisation des MAPK (pour *mitogen-activated protein kinase*) ce qui induit un remodelage de l'actine permettant un mouvement latéral et une relocalisation des complexes HCV-E2/CD81/CLDN1.

CLDN1 est une protéine à quatre domaines transmembranaires impliquée dans la formation des jonctions serrées. Elle est fortement exprimée dans les hépatocytes et également décrite dans d'autres tissus épithéliaux. CLDN1 est principalement localisée à la membrane apicale des hépatocytes mais peut également être présente aux niveaux des membranes basolatérales (Evans et al., 2007). L'expression basolatérale de CLDN1 est par ailleurs augmentée lors d'une infection par le HCV (Reynolds et al., 2008). La localisation de CLDN1 dans les cellules serait un facteur déterminant de la permissivité cellulaire au HCV (Yang et al., 2008). En effet dans des cellules HeLa, l'expression ectopique de CLDN1 aboutit à sa localisation dans des vésicules intracellulaires ne permettant pas l'infection par le HCV (Yang et al., 2008). En l'absence de CLDN1, les CLDN6 et CLDN9 peuvent également permettre l'entrée des HCVpp dans les lignées cellulaires (Haid et al., 2013; Meertens et al., 2008 ; Zheng et al., 2007). Une étude récente a cependant démontré que l'infection des hépatocytes par le HCV serait indépendante des CLDN6 et CLDN9 (Fofana et al., 2013b).

CLDN1 n'interagit pas directement avec du sE2 ou avec des HCVcc (Evans et al., 2007). Cependant, des anticorps dirigés contre CLDN1 sont capables d'inhiber l'attachement du sE2 et des HCVcc à la surface de cellules hépatocytaires (Krieger et al., 2010). Récemment une interaction directe entre CLDN1 et des hétérodimères E1E2 a pu être observée (Douam et al., 2013). Le rôle de cette interaction dans l'entrée virale reste à caractériser. CLDN1 forme des complexes de co-récepteur avec le CD81 à la surface de cellules susceptibles à l'entrée du HCV. Ces associations CLDN1-CD81 à la membrane cellulaire sont essentielles à l'entrée du HCV (Harris et al., 2008). En effet, l'utilisation d'anticorps bloquant cette interaction a été démontrée comme efficace pour empêcher l'entrée et l'infection par le HCV (Krieger et al., 2010). Il a été démontré par Harris et al. que CLDN1 colocalise principalement avec CD81 au niveau de la membrane basolatérale et peu au niveau des jonctions serrées (Harris et al., 2010). C'est ainsi la

localisation basolatérale des complexes CLDN1-CD81 qui jouerait un rôle dans l'infection par le HCV. Il a également été démontré que le HCV stimulerait le trafic des récepteurs et notamment du complexe CD81-CLDN1, afin de promouvoir son endocytose (Farquhar et al., 2012). Les paramètres de diffusion de ces récepteur seraient ainsi des éléments importants régulant l'infection par le HCV (Harris et al., 2013).

Occludine (OCLN) est une protéine à quatre domaines transmembranaires exclusivement exprimée au niveau des jonctions serrées. Elle est exprimée de façon ubiquitaire dans la plupart des cellules. OCLN est un facteur important pour l'entrée virale capable d'interagir directement avec E2 (Benedicto et al., 2008 ; Liu et al., 2009; Ploss et al., 2009). Il a été notamment suggéré qu'après endocytose de la particule virale, OCLN pourrait jouer un rôle dans la fusion du virus avec la membrane de l'endosome (Benedicto et al., 2009). De même que le CD81, OCLN est un facteur majeur responsable de la spécificité d'espèce (Ploss et al., 2009).

Le récepteur à tyrosine kinase EGFR a été identifié comme un co-facteur d'entrée et d'infection du HCV (Lupberger et al., 2011). L'EGFR est une glycoprotéine fortement exprimée dans le foie pouvant être activée par de nombreux ligands dont l'EGF. Une fois activée il y a dimérisation du récepteur et phosphorylation des résidus tyrosine intracellulaires activant le domaine kinase. Ces résidus phosphorylés permettent la liaison de l'EGFR à des protéines intracellulaires et de ce fait, l'activation de voies de signalisation. L'EGFR n'interagit pas directement avec le virus, mais par l'intermédiaire des voies de signalisation des MAPK (pour *mitogen-activated protein kinase*), il régule la formation du complexe CD81-CLDN1 (Diao et al., 2012; Lupberger et al., 2008 ; Zona et al., 2013).

NPC1L1 (pour *Niemann-Pick C1-like 1*) est une protéine à treize domaines transmembranaires exprimée à la membrane apicale des entérocytes ainsi qu'au niveau des canalicules biliaires dans les hépatocytes. NPC1L1 joue un rôle dans l'absorption ainsi que dans l'homéostasie du cholestérol cellulaire (Betters and Yu, 2010). Récemment il a été démontré que NPC1L1 est un facteur d'entrée du HCV intervenant à une étape précoce du cycle viral avant la fusion membranaire (Sainz et al., 2012). L'inhibition de la fonction de ce récepteur par des anticorps ou bien par l'ezetimibe, empêche l'infection des hépatocytes par les différents génotypes du HCV *in vitro* et retarde l'établissement de l'infection dans les modèles *in vivo* (Sainz et al., 2012). Il reste néanmoins à mieux définir la nature exacte des interactions entre le HCV et NPC1L1.

Ces premières étapes du cycle viral sont essentielles à une infection efficace par le HCV. Cependant, ce processus est extrêmement complexe et fait intervenir un nombre important de

facteurs cellulaires. Cette liste de facteurs utilisés par le HCV ne fait qu'accroître avec la découverte récente d'un rôle de la glycoprotéine CD63 (Park et al., 2013) ainsi que du récepteur à la transferrine 1 (TfR1) (Martin and Uprichard, 2013). CD63 est une tétraspanine impliquée dans l'endocytose dépendante de la clathrine ainsi que dans le trafic des lysosomes. CD63 est capable d'interagir avec E2 et l'inhibition de son expression cellulaire ou l'utilisation d'anticorps anti-CD63 diminue l'entrée du HCV dans les hépatocytes. CD63 pourrait ainsi jouer un rôle lors de l'endocytose du HCV (Park et al., 2013). TfR1 joue un rôle majeur dans l'absorption du fer par les cellules, or il a été observé qu'au cours de l'infection par le HCV, l'homéostasie du fer est affectée (Martin and Uprichard, 2013). Martin et al. ont ainsi inhibé ou bloqué l'expression de TfR1 dans les cellules et ont observé une diminution de l'entrée du HCV. Les auteurs suggèrent un rôle de TfR1 dans l'internalisation du HCV dans les hépatocytes (Martin and Uprichard, 2013).

Après interactions avec les différents récepteurs, le virus est endocyté de manière dépendante de la clathrine en parallèle avec les complexes CD81-CLDN1 (Blanchard et al., 2006 ; Codran et al., 2006 ; Farquhar et al., 2012; Meertens et al., 2006). Cette étape d'endocytose clathrine dépendante peut notamment être bloquée par l'arbidol (Blaising et al., 2013b). Les récepteurs CD81, SR-BI et CLDN1 interagissent probablement à des étapes précoces et à des temps étroitement liés au cours de l'entrée du HCV alors qu'OCLN interviendrait à des étapes un peu plus tardives (Krieger et al., 2010 ; Sourisseau et al., 2013; Zeisel et al., 2007b). Suite à cette internalisation, la fusion a lieu dans les endosomes précoces. Cette fusion est dépendante d'un pH bas et implique à la fois les protéines virales ainsi que des facteurs cellulaires (CD81, CLDN1, OCLN, EGFR et EphA2) (Benedicto et al., 2009; Blanchard et al., 2006 ; Evans et al., 2007 ; Lupberger et al., 2011 ; Tscherne et al., 2006) Les GPs E1 et E2 contiennent plusieurs domaines de fusion potentiels (Drummer et al., 2007 ; Kobayashi et al., 2006; Lavillette et al., 2006 ; Lavillette et al., 2007). Haid et al. ont démontré qu'E2, les lipides cellulaires ainsi que les lipides de l'enveloppe virale joueraient un rôle majeur dans la fusion. L'utilisation d'anticorps anti-E2 ainsi que de mutants d'E2 peuvent bloquer la fusion virale avec des liposomes. Cette étude a également montré que les particules virales de faible densité sont plus efficaces en terme de fusion que les particules de plus haute densité (Haid et al., 2009). Pécheur et al. ont également confirmé le rôle joué par les lipides cellulaires en produisant des particules HCV appelées eLVP (pour *empty* LVP). Ces eLVP sont obtenues après transduction de cellules de colon Caco-2 avec les GPs E1 et E2 du HCV. Les cellules Caco-2, contrairement aux cellules Huh7.5, produisent efficacement des VLDL. Ils ont observé que les eLVP produites à partir des Caco-2 présentent des capacités de fusion supérieures à celles produites à partir des Huh7.5. Cette fusion est également pH et apoB dépendante (Pecher et al., 2010). La fusion virale dépend donc de certains récepteur, des GPs du HCV ainsi que de l'association virale avec les lipoprotéines.

Les autres étapes du cycle viral

Après fusion de l'enveloppe virale avec la membrane de l'endosome, la nucléocapside se dissocie pour libérer l'ARN viral dans le cytoplasme où va avoir lieu la traduction. La traduction de l'ARN du HCV est dépendante d'un IRES situé dans la région 5'UTR. L'IRES comporte des domaines hautement conservés qui recrutent la sous-unité 40S du ribosome au niveau de l'ARN viral (Hoffman and Liu, 2011). Après traduction et maturation de la polyprotéine, les protéines structurales et non-structurales se retrouvent associées à des membranes dérivées du RE.

La réplication est une étape importante dans le cycle viral. Un génome ARN négatif va être généré et servira de matrice afin de produire d'autres brins ARN positifs. Ces ARNs synthétisés seront soit à nouveau répliqués et traduits ou bien pourront être assemblés dans une particule virale (Bartenschlager et al., 2010). Cette étape de réplication est intimement liée à miR-122. MiR-122 est un micro-ARN spécifique du foie capable de lier la région 5'UTR du HCV et d'optimiser sa réplication. MiR-122 est l'un des facteurs expliquant le tropisme majeur du HCV pour les hépatocytes (Da Costa et al., 2012 ; Narbus et al., 2011). MiR-122 pourrait également être impliqué dans l'étape de traduction virale (Henke et al., 2008; Wilson et al., 2011).

De part la difficulté d'étudier l'assemblage des particules virales, cette étape du cycle du HCV reste à ce jour basée sur plusieurs hypothèses et plusieurs modèles (Bartenschlager et al., 2011). Il semblerait que la formation de la nucléocapside soit initiée directement à la surface des LDs. L'ARN viral serait ensuite amené à proximité de core par NS5A (également présente autour des LDs) (Bartenschlager et al., 2011 ; Miyanari et al., 2007) . L'enveloppement du virus aurait lieu dans des microdomaines riches en lipides des membranes du RE. Cette zone est enrichie en LDs et représente la zone de synthèse des précurseurs des VLDL appelés luLDs (Bartenschlager et al., 2011). L'assemblage du HCV ainsi que sa maturation auraient donc lieu de manière parallèle à la formation des VLDL (Gastaminza et al., 2008). Il est mal compris comment les GPs sont amenées aux sites d'assemblage. Néanmoins NS2 pourrait interagir avec les GPs ainsi que les autres protéines non-structurales afin de les rassembler à proximité des LDs (Ma et al., 2011). Enfin, l'association du HCV avec les VLDL naissants dans la lumière du RE permet au virus d'emprunter la voie de sortie des VLDL, libérant les particules virales produites (Huang et al., 2007).

II. Rôle majeur des lipides pour le HCV

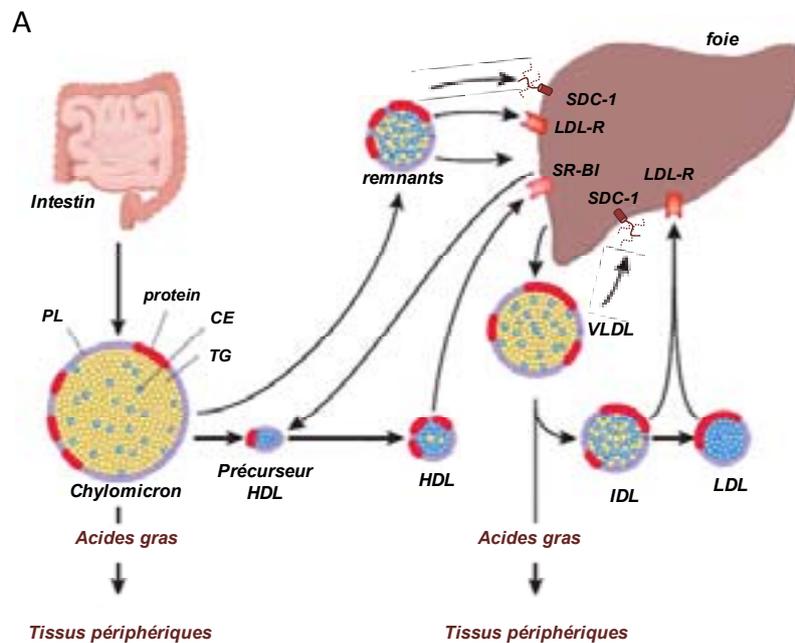
La caractérisation des virus circulant chez les patients a démontré que le HCV est présent dans le sang sous la forme de particules virales associées aux TRLs, formant les LVP. Ceci se traduit par une importante hétérogénéité des densités virales en fonction des lipoprotéines avec lesquelles sont associés les virus (Thomssen et al., 1993). L'ultracentrifugation du sérum de patients infectés par le HCV sur un gradient de densité a montré que l'ARN du HCV est présent dans les particules de faible et de haute densité (Andre et al., 2002 ; Nielsen et al., 2006). Les expériences sur le chimpanzé ont cependant montré que seules les particules virales de faible densité (≤ 1.09 g/L) provenant d'un sérum de patient sont infectieuses (Hijikata et al., 1993). Ce chapitre décrit le métabolisme des lipides afin de comprendre la formation et la composition des LVP ainsi que d'évaluer l'importance des lipides et des lipoprotéines dans le cycle du HCV.

1. Le métabolisme des lipoprotéines

Le foie est l'organe principal de l'homéostasie des lipides, régulée en grande partie par les lipoprotéines. Les lipoprotéines contiennent des triglycérides (TG) ainsi que des cholestérols esters (CE) et sont entourées de phospholipides ainsi que de diverses protéines. Elles sont sécrétées à partir de l'intestin (sous forme de chylomicrons (CM)) et du foie (sous forme de VLDL) (figure 9A). Les CM et VLDLs vont être lysés dans la circulation afin de délivrer des acides gras aux tissus (tels que les muscles squelettiques et les adipocytes) (Lusis and Pajukanta, 2008). Les restes des chylomicrons (appelés couramment *remnant*) vont être récupérés par le foie. Les VLDL vont retourner dans la circulation sous forme d'une lipoprotéine de taille intermédiaire (IDL pour *intermediate density lipoprotein*). Une partie des IDL est également récupérée par le foie et la seconde partie va être métabolisée afin de donner les LDL riches en cholestérol. Les LDL sont les principales particules porteuses de cholestérol chez l'homme. (Lusis and Pajukanta, 2008). Les HDL sont produites par une voie différente et constituent un réservoir d'apolipoprotéines échangeables. Les apolipoprotéines sont des protéines associées aux lipides, constitutives des lipoprotéines, avec des fonctions structurales et métaboliques. En effet, les lipoprotéines peuvent être caractérisées par les apolipoprotéines présentes à leur surface (Bassendine et al., 2011). Certaines sont transférables d'une lipoprotéine à une autre, comme apoE et les apolipoprotéines C (apoC), AI (apoAI) et AII (apoAII), alors que d'autres sont structurales comme les apoB (Bassendine et al., 2011). Les localisations des différentes apolipoprotéines sont résumées en figure 9B.

ApoE est un ligand majeur des récepteurs hépatiques (ex. LDL-R, HSPG, SR-BI) qui sont eux-mêmes chargés de récupérer les résidus des CM et VLDL riches en TG (Bassendine et al., 2011). Il existe trois isoformes d'apoE (apoE2, apoE3, apoE4) qui diffèrent par seulement deux acides aminés. Cependant ces différences ont un effet sur la structure d'apoE, et vont modifier

son affinité pour le LDL-R. Cette baisse d'affinité affecte les capacités d'absorption des lipoprotéines par les hépatocytes (Bassendine et al., 2011). ApoB joue un rôle majeur dans l'assemblage des VLDL ainsi que dans la structure des VLDL et des LDL. Les multiples voies de dégradation d'apoB permettent de réguler le nombre de VLDL sécrétés par la cellule (Ginsberg and Fisher, 2009). ApoAI est l'apolipoprotéine principale des HDL et peut interagir avec le récepteur cellulaire SR-BI. ApoAII est associée aux HDL mais peut également être associée aux VLDL et réguler leur métabolisme (Bassendine et al., 2011). Enfin apoC fait partie des lipoprotéines échangeables et joue un rôle important dans la régulation de la lipolyse.



B

apolipoprotéine	chylomicrons	VLDL	IDL	LDL	HDL
		<1,006 g/ml	1,006 - 1,019 g/ml	1,019 - 1,063 g/ml	>1,063 g/ml
AI	Ex	Ex			Ex
AII	Ex	Ex			Ex
B		St	St	St	
C	Ex	Ex	Ex		Ex
E	Ex	Ex	Ex		Ex

Figure 9. Résumé du métabolisme des lipoprotéines. (A) Les triglycérides sont sécrétés à partir de l'intestin sous forme CM et du foie sous forme de VLDL. Les CM et VLDL vont être lysés dans la circulation afin de délivrer des acides gras aux tissus périphériques. Les restes des chylomicrons (*remnant*) vont être récupérés par le foie par des récepteurs dont le LDL-R et SR-BI. Les TRLs peuvent être récupérés par le foie via SDC-1. Une partie des VLDL va être métabolisée afin de donner les LDL riches en cholestérol. Les HDL sont produites par une voie différente. *CM* : chylomicrons. *CE* : cholestérols esters. *HDL* : lipides de haute densité. *IDL* : lipides de densité intermédiaire. *LDL* : lipides de faible densité. *PL* : phospholipides. *SDC-1* : syndécan 1. *TG* : triglycérides. *TRLs* : lipoprotéines riche en triglycérides. *VLDL* : lipides de très

faible densité. Figure adaptée de (Lusis and Pajukanta, 2008). (B) Distribution des principales apolipoprotéines dans les différentes lipoprotéines. Ex : *apo*lipoprotéine échangeable ; *St* : *apo*lipoprotéine structurale.

2. Les lipo-viro-particules

Une particularité unique du HCV est de circuler dans le sang sous forme de particules virales associées aux lipoprotéines riches en TRLs, formant les LVP. L'assemblage des virions s'effectue à proximité des LDs et du RE. L'assemblage ainsi que la libération des particules virales sont liés à la synthèse des VLDL (Bartenschlager et al., 2011; Benga et al., 2010). De manière simplifiée, une VLDL est produite par fusion d'un précurseur (VLDL2) contenant l'*apo*B et formé au niveau du RE rugueux avec un second précurseur (luDL) contenant l'*apo*E et formé à proximité des LDs et de RE lisse. Par un mécanisme encore mal connu les GP seraient transférées du RE à la surface des luDL et la nucléocapside du HCV insérée dans le core de la luDL en formation. La fusion des deux précurseurs aboutit à la LVP (Bartenschlager et al., 2011) (Figure 10).

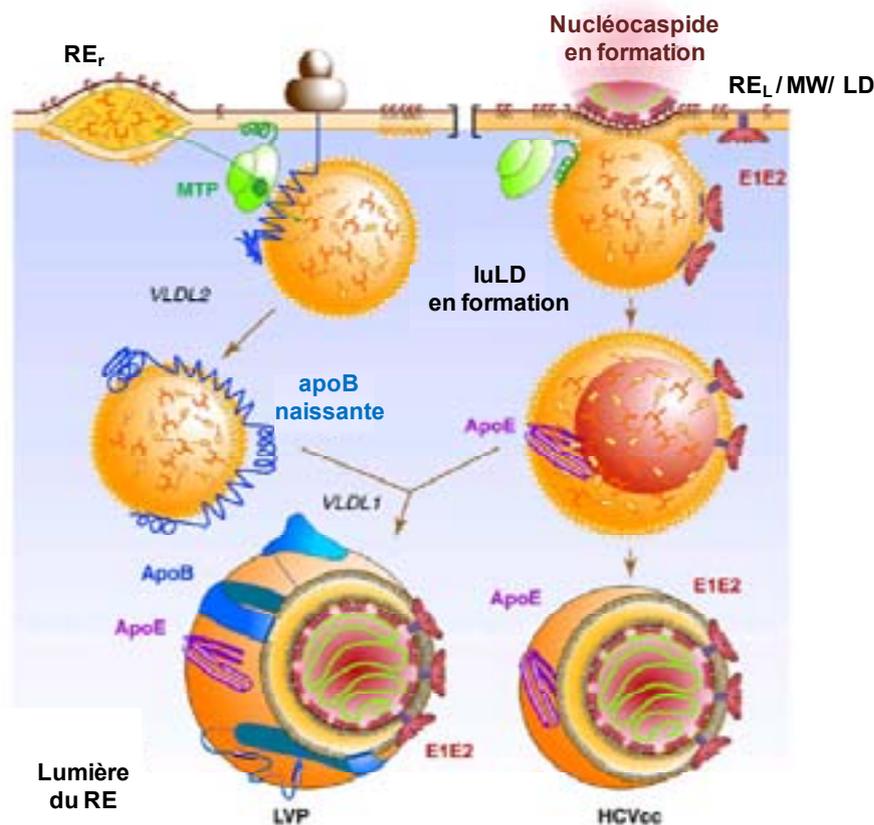


Figure 10. Biogenèse des VLDL et des particules virales. Une VLDL est produite par fusion d'un précurseur (VLDL2) contenant l'*apo*B et formé au niveau du RE rugueux avec un second précurseur (luDL) contenant l'*apo*E et formé à proximité des LDs et de RE lisse. Par un mécanisme encore mal connu les GP seraient transférées du RE à la surface des luDL et la nucléocapside du HCV insérée dans le core de la luDL en formation. La fusion des deux précurseurs aboutit à la LVP. *rER* : réticulum endoplasmique rugueux. *sER* : réticulum endoplasmique lisse. *MTP* : protéine de transfert des lipides. (Bartenschlager et al., 2011)

Des études de spectrométrie de masse ont montré que la composition lipidique des HCVcc est proche de celle des VLDL et des LDL (Merz et al., 2011). Les virions peuvent également être immunoprécipités avec des anticorps anti-apoE, apoB et apoC1 et apoA1 suggérant leur présence à la surface de la LVP (Andre et al., 2002 ; Catanese et al., 2013b; Chang et al., 2007 ; Icard et al., 2009 ; Merz et al., 2011 ; Meunier et al., 2008a ; Nielsen et al., 2006 ; Thomssen et al., 1992).

Des études biochimiques réalisées à partir de sérums de patient infectés ont montré que l'ARN du HCV était présent à la fois dans les particules de faible et de haute densité avec un pic d'ARN autour de 1,05 g/ml. D'importantes variations sont néanmoins observées en fonction des patients (Andre et al., 2002 ; Gastaminza et al., 2006; Lindenbach et al., 2005 ; Thomssen et al., 1993 ; Wakita et al., 2005). Dans des études réalisées à partir de virus produits en culture cellulaire le pic d'ARN viral est retrouvé dans les gradients de densité autour de 1,14 g/ml. De manière intéressante, ces fractions de densité ayant les taux les plus élevés d'ARN présentent une infectiosité relativement faible. Les virus les plus infectieux seraient plutôt retrouvés dans les fractions autour de 1.09 - 1.10 g/ml où moins d'ARN est détecté (Lindenbach et al., 2005). Il existe donc une différence de distribution entre le pic d'ARN du HCV et son pic d'infectiosité (Gastaminza et al., 2006). Les chimpanzés et souris chimères peuvent être infectés par des HCVcc. L'étude des virus provenant de ces animaux infectés montre que le pic de l'ARN viral est retrouvé majoritairement autour de 1.10 g/ml (Lindenbach et al., 2006). Cette différence de densité observée entre les virus produits *in vitro* et *in vivo* peut être expliquée par le fait que les cellules Huh7 sécrètent des particules de taille plus proche des LDL que des VLDL (Meex et al., 2011). Le type de cellules productrices utilisé a donc un impact sur les propriétés des LVP produites. Jammart et al. ont cependant observé que des virus produits à partir de cellules sécrétant de grandes quantités de VLDL ne sont pas plus associés aux TRL que ceux produits à partir de cellules Huh7 normales (Jammart et al., 2013). Ces résultats suggèrent que la capacité de cellules à produire des VLDL n'est pas corrélée à la production de LVP (Jammart et al., 2013).

3. Rôle des lipides et des lipoprotéines dans le cycle viral

De très nombreuses données démontrent l'utilisation du métabolisme lipidique hépatocytaire par le HCV. En effet, en plus d'être associé physiquement aux lipoprotéines, le HCV requiert également les lipides intracellulaires à plusieurs étapes de son cycle viral. Les apolipoprotéines telles qu'apoE, apoB, apoC1 et apoA1 jouent un rôle important aux étapes d'entrée, d'assemblage et de libération des particules virales. ApoE joue probablement de multiples rôles dans le cycle viral ; de l'étape d'entrée à l'assemblage des particules virales (Chang et al., 2007). En effet apoE participe à l'attachement de la LVP à la surface cellulaire en interagissant avec différents récepteurs comme le LDL-R, les syndécans et SR-BI (Dao Thi et al., 2012; Jiang et al., 2012 ;

Owen et al., 2009 ; Shi et al., 2013). L'analyse du contenu en lipoprotéines des HCVcc a montré que chaque particule virale présenterait un nombre important de molécules d'apoE à sa surface (Catanese et al., 2013b). Ce nombre est probablement largement supérieur aux 5 à 7 molécules d'apoE estimées à la surface des VLDL, suggérant un enrichissement majeur en apoE des particules virales (Tomiyasu et al., 2001). ApoE peut également interagir avec NS5A au cours de l'infection par le HCV (Benga et al., 2010; Cun et al., 2010). De part le rôle joué par NS5A dans le recrutement du complexe de réplication aux LDs, apoE en interaction avec NS5A aurait ainsi une fonction dans l'assemblage des particules virales (Benga et al., 2010).

Le rôle exact d'apoB dans le cycle du HCV reste à déterminer. ApoB jouerait un rôle dans la production virale (Gastaminza et al., 2008). Les travaux de Nahmias et al. décrivent une inhibition de 70% de la sécrétion de HCV lors d'une diminution de l'expression d'apoB (Nahmias et al., 2008).

ApoCI est une apolipoprotéine notamment associée aux HDL. Dreux et al. ont démontré qu'apoCI serait recrutée par les GPs du HCV et augmenterait les capacités de fusion du virus avec l'endosome (Dreux et al., 2006). Un rôle d'apoCI plus tardif dans le cycle du HCV est également envisageable de part ses hautes affinités pour les surfaces lipidiques (Meunier et al., 2008a).

Un rôle d'apoAI dans le cycle du HCV a également été décrit. En effet, l'inhibition de l'expression d'apoAI affecte la réplication ainsi que la production de particules virales (Mancone et al., 2011). Plusieurs études ont démontré que les HDL, ligands naturels de SR-BI, peuvent augmenter l'entrée de HCVpp et HCVcc dans les cellules (Bartosch et al., 2005 ; Dreux et al., 2006; Voisset et al., 2005). Cette potentialisation de l'entrée du virus nécessite la présence d'apoAI et apoAII, la fonction de transfert du cholestérol de SR-BI ainsi que la région HVR1 de E2. Des interactions complexes entre E2, SR-BI et les HDL sont probablement mises en place au cours de l'infection et jouent un rôle majeur dans l'entrée virale. De plus ces interactions participent également à l'échappement viral aux anticorps en dissimulant des épitopes viraux (Bartosch et al., 2005 ; Dreux et al., 2006).

De manière plus générale, le rôle des apolipoprotéines dans le cycle du HCV est intimement lié au fait que le virus utilise les voies d'assemblage et d'export des VLDL.

Le HCV utilise également plusieurs récepteurs impliqués dans le métabolisme du cholestérol : le récepteur SR-BI (dont la fonction essentielle est le transfert bidirectionnel du cholestérol), le récepteur NPC1L1 (dont la fonction est de réabsorber les cholestérols non estérifiés sécrétés dans la bile) et enfin le LDL-R. Le contenu en cholestérol des virions ainsi que de la membrane cellulaire constitue un paramètre important pour le HCV (Aizaki et al., 2008). En effet une déplétion du cholestérol cellulaire induit une inhibition de l'infection virale (Kapadia et al., 2007). A la surface cellulaire, on retrouve des microdomaines enrichis en cholestérol où l'on

retrouve notamment le récepteur CD81. La perturbation de ces microdomaines influence l'entrée virale en affectant la localisation et la dynamique du CD81 (Kapadia et al., 2007). Ceci suggère que certains lipides sont essentiels à l'entrée virale. Le cholestérol entrant dans la composition de la LVP elle-même, est également important à la fois pour l'infectiosité et la réplication virale (Aizaki et al., 2004 ; Aizaki et al., 2008 ; Sainz et al., 2012).

III. HCV et réponses immunitaires : l'échappement du HCV

Le HCV possède d'importantes capacités d'adaptation lui permettant d'échapper efficacement aux réponses immunitaires et de persister chez son hôte. Les 20% de patients qui parviennent à éliminer de manière spontanée le virus, montrent cependant que le développement d'une réponse immunitaire efficace peut maîtriser l'infection virale (Barth et al., 2011; Pestka et al., 2007 ; Thimme et al., 2001). Ces dix dernières années, de nombreuses études ont été menées afin de mieux comprendre les facteurs immunologiques qui conduisent soit à l'élimination soit à la persistance du HCV (Feinstone et al., 2012 ; Halliday et al., 2011; Thimme et al., 2012).

1. Immunité innée et échappement viral

Après infection par le HCV, une réponse immunitaire précoce est mise en place. Des éléments de la particule virale notamment l'ARN viral, sont reconnus par les récepteurs appelés PRR pour *pattern recognition receptor*. Des interférons de type I (IFN- α and - β) sont alors produits par les hépatocytes infectés et les cellules dendritiques (DC pour *dendritic cell*) immatures. Ces IFNs limitent la réplication du HCV dans les cellules et empêchent l'infection des cellules voisines non-infectées (Gale and Foy, 2005). Les DC récupèrent également des éléments viraux à partir de cellules infectées ou mortes et après migration dans les ganglions lymphatiques permettent d'amorcer l'immunité adaptative. La production de grandes quantités de cytokines au site de l'infection par les DC contribue à activer plus fortement les réponses immunitaires innées (Lambotin et al., 2010). Les IFN de type I et les cytokines pro-inflammatoires permettent de stimuler les cellules *natural killer* (NK) (Lambotin et al., 2010). Les NK reconnaissent et détruisent les cellules infectées, et libèrent également des cytokines pro-inflammatoires. La régulation des NK dépend de nombreux récepteurs inhibiteurs ou stimulateurs présents à la surface cellulaire. Ces récepteurs répondent à diverses molécules telles que les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de type I (MHC-I), les ligands induits par le stress cellulaire et des éléments du non-soi reconnus par les récepteurs Toll-like (TLR pour *toll-like receptor*) (Vivier et al., 2008). Les cellules NK sont activées aux phases aiguës et chroniques de l'infection par le HCV (Cheent and Khakoo, 2011).

Le HCV développe des stratégies multiples afin d'éviter d'être reconnu et détruit par les réponses immunitaires innées (Gale and Foy, 2005 ; Rehmann, 2009 ; Thimme et al., 2012). Les protéines du HCV peuvent à la fois diminuer les capacités de détection virale afin de réduire l'induction des IFN de type I et interférer dans la signalisation dépendante des IFN de type I (Rehmann, 2009). Le complexe NS3-4A inactive la protéine MAVS (pour *mitochondrial antiviral signalling protein*) qui est un adaptateur entre l'ARN viral et le PRR RIG-I. Ceci empêche la reconnaissance de l'ARN viral par le PRR et l'initiation d'une réponse antivirale (Meylan et al.,

2005). NS4B interfère également dans la production d'IFN liée à RIG-I (Nitta et al., 2013). Enfin, la protéine core peut se lier à STAT1, ce qui bloque sa phosphorylation et son hétérodimerisation. Cette action empêche la transcription de gènes stimulés par l'IFN (Lin et al., 2005). Les fonctions des DC sont également modifiées lors de l'infection par le HCV. Ces altérations modifient le profil des cytokines avec une faible production des cytokines pro-inflammatoires IL-12 et IFN- α et une augmentation de la production de l'IL-10. L'altération des DC réduit également leur capacité à stimuler l'activation et la prolifération des lymphocytes T (Lambotin et al., 2010). De plus, les DC pourrait favoriser le transport du HCV et contribuer à sa dissémination (Lambotin et al., 2010). Enfin, bien que des réponses des NK soient observées lors d'une infection chronique, la fréquence, le phénotype et la fonction des cellules NK sont modifiées par le HCV (Cheent and Khakoo, 2011). Le virus oriente le profil de cytokine des NK vers un environnement plus permissif et tolérant à la persistance du HCV (Cheent and Khakoo, 2011). La protéine core peut notamment sur-exprimer l'expression des molécules du MHC-I et du HLA-E (ligand d'un des récepteurs inhibiteurs des NK) afin de favoriser les signaux inhibiteurs aux NK. Au final, ces capacités du HCV à interférer avec le système immunitaire inné ont également pour conséquence de retarder l'induction des réponses immunitaires adaptatives.

2. Immunité adaptative et échappement viral

L'élimination de l'infection virale nécessite le développement de réponses immunitaires spécifiques impliquant à la fois l'immunité cellulaire et humorale.

i. L'immunité cellulaire

Rôle de l'immunité cellulaire dans le contrôle de l'infection par le HCV

Les lymphocytes T jouent un rôle majeur dans le développement d'une immunité HCV spécifique efficace (Rehermann, 2009). Ils sont détectables dans les 5 à 9 semaines suivant l'infection (Thimme et al., 2002). Au cours de la phase aiguë de l'infection, l'élimination spontanée du virus est associée à une prolifération vigoureuse des cellules T CD4+ HCV spécifiques avec une production d'IL-2 et d'IFN γ . A l'inverse, une réponse CD4+ faible et peu spécifique est observée chez les patients développant une hépatite chronique (Gerlach et al., 1999 ; Kaplan et al., 2007; Urbani et al., 2006). Cette réponse CD4+ nécessite à la fois d'être forte au moment de l'infection, mais également d'être maintenue dans le temps pour un contrôle à long terme de l'infection (Gerlach et al., 1999).

Plusieurs études décrivent un rôle majeur des cellules T CD8+ dans l'infection du HCV. Une corrélation est observée entre l'apparition de réponses spécifiques CD8+ et l'élimination virale (Cooper et al., 1999 ; Thimme et al., 2001). A l'inverse la déplétion des CD8+ chez le chimpanzé mène à une persistance du HCV (Shoukry et al., 2003). Les effets anti-HCV des CD8+ sont

principalement attribués à la production d'IFN γ et peu à la cytolyse (Jo et al., 2009). Au cours de l'infection chronique, des cellules CD8 $^+$ HCV spécifiques produisent de l'IL-17 et ciblent des épitopes différents des cellules productrices d'IFN γ . Elles auraient un rôle protecteur dans l'infection chronique par le HCV (Graffmueller et al., 2012).

Stratégies d'échappement viral aux réponses cellulaires

Bien que l'immunité adaptative participe au contrôle du HCV, la majorité des patients ne parvient pas à éliminer le virus et développe une hépatite chronique. L'échappement viral aux réponses cellulaires est basé à la fois sur des facteurs spécifiques du virus et de l'hôte (Rehermann, 2009). La variabilité importante du virus lui permet d'échapper continuellement aux réponses cellulaires T CD8 $^+$. Plusieurs études suggèrent également que les cellules HCV-spécifiques CD8 $^+$ présentent des défauts de fonctionnement aboutissant à des capacités réduites de prolifération et de sécrétion de cytokines (Thimme et al., 2012). Ceci serait à la fois la conséquence d'une aide insuffisante des lymphocytes CD4 $^+$, de l'action de cellules T régulatrices ou encore de cytokines immunosuppressives (Thimme et al., 2012). En effet, le développement d'une réponse cellulaire CD4 $^+$ HCV spécifique est importante pour la génération et le maintien d'une réponse cellulaire CD8 $^+$ efficace (Rehermann, 2009). De plus, la présence chez les patients chroniquement infectés de cellules T CD8 $^+$ produisant de l'IL-10 ainsi que de cellules T régulatrices CD4 $^+$ et CD25 $^+$ orienterait vers une suppression des réponses cellulaires HCV spécifiques (Thimme et al., 2012).

ii. L'immunité humorale

Rôle de l'immunité humorale dans le contrôle de l'infection par le HCV

Les réponses immunitaires humorales ont été longtemps considérées comme jouant un rôle mineur dans l'infection par le HCV. Cependant, l'amélioration des modèles d'études (notamment grâce au modèle HCVpp), a permis de démontrer que les nAbs contribuent à la fois à l'élimination virale lors d'une primo-infection ainsi qu'à la protection au cours de la réinfection (Fafi-Kremer et al., 2012; Farci et al., 1994 ; Feray et al., 1998). L'étude de la cinétique des réponses humorales au cours de la phase aiguë de l'infection par le HCV, montre une corrélation entre la présence de nAbs et une diminution de la virémie (Lavillette et al., 2005). Ces résultats ont été confirmés par une autre étude réalisée à partir d'une cohorte de femmes contaminées avec une même souche du HCV (Pestka et al., 2007). Il a pu être démontré que l'élimination virale est associée à la présence de nAbs durant la phase aiguë de l'infection. La quantité d'anticorps circulant ainsi que leur efficacité diminuent ensuite dans le temps. A l'inverse chez les patients progressant vers une hépatite chronique, peu de nAbs sont détectés durant la phase aiguë de l'infection mais ce titre augmente par la suite au cours de la chronicité (Pestka et al.,

2007). Ainsi une production rapide et forte de nAbs contribue au contrôle de l'infection au cours de la phase aiguë et facilite l'élimination virale (Pestka et al., 2007 ; Raghuraman et al., 2012).

En plus de leur rôle dans l'élimination virale spontanée, les nAbs jouent également un rôle dans la protection contre la réinfection. L'étude d'individus utilisant des drogues injectées par voie intraveineuse a montré qu'un pourcentage élevé de personnes ayant éliminées de manière spontanée le virus une première fois, était capable d'éliminer le virus une seconde fois lors d'une réexposition au HCV (Osburn et al., 2010). Un taux supérieur d'anticorps à activité neutralisante croisée (cross-nAbs) a été détecté chez ces personnes comparé au taux détecté chez les patients développant une hépatite chronique. La protection contre la réinfection est donc associée à une production importante de cross-nAbs capables de réduire voire de complètement contrôler la virémie (Barth et al., 2011; Osburn et al., 2010).

L'entrée virale : la cible majeure des anticorps neutralisants

L'entrée virale constitue une cible de choix pour les nAbs (Barth et al., 2006a; Zeisel et al., 2007a). Plusieurs stratégies sont possibles pour éviter que le HCV entre dans la cellule et se dissémine. Les nAbs peuvent : *i*) interférer dans l'attachement viral à la cellule cible, *ii*) empêcher les interactions du virus avec les facteurs d'entrée, *iii*) bloquer l'endocytose virale et *iiii*) cibler les épitopes nécessaires à la fusion (Fafi-Kremer et al., 2008 ; Zeisel et al., 2007a).

Les GPs E1-E2 du HCV sont les cibles principales des nAbs. Il existe peu de données sur la GP E1 qui semble être moins immunogène que E2 (Fournillier et al., 2001 ; Meunier et al., 2008b). De nombreux épitopes ciblés par des nAbs ont été mis en évidence au niveau de la GP E2, en particulier au niveau des HVR et des domaines de liaison au facteur cellulaire CD81 (Fauvelle et al., 2011). Plus particulièrement, la région HVR1 contient un épitope immunodominant qui peut varier de plus de 80 % entre les génotypes du HCV et même parmi les sous-types d'un même génotype (Fauvelle et al., 2011). Les nAbs ciblant HVR1 sont ainsi spécifiques d'un isolat et ne possèdent pas d'activité neutralisante croisée (Fauvelle et al., 2011; Vieyres et al., 2011). De nombreux autres épitopes sont situés au niveau ou à proximité des domaines de liaison au CD81 (Keck et al., 2008; Keck et al., 2004 ; Law et al., 2008 ; Triyatni et al., 2002). De par leur fonction d'interaction avec le CD81, ils sont relativement conservés et des nAbs dirigés contre ces épitopes sont plus susceptibles de présenter des capacités de neutralisation croisée (Fauvelle et al., 2011).

Stratégies d'échappement viral aux réponses humorales

Bien que le HCV soit capable d'induire des réponses immunitaires humorales protectrices, la majorité des patients développent une hépatite chronique. Le fait que le HCV circule chez les patients sous la forme d'une quasi-espèce, en évolution constante et rapide est un point essentiel. La présence simultanée de nombreux variants permet une sélection rapide des

mutants les plus adaptés à l'environnement de l'hôte et permet une persistance malgré la présence des nAbs (Fafi-Kremer et al., 2012). Une élimination du HCV a pu être corrélée à une population virale plus lente à s'adapter alors qu'une évolution rapide de la quasi-espèce est généralement associée à une chronicité (Farci et al., 2000). Par des mutations au niveau des GPs et notamment au niveau d'HVR1, le virus parvient à échapper à la réponse humorale. La rapidité et la fréquence des mutations sont telles, que la réponse humorale de l'hôte est souvent incapable de s'adapter au changement de la quasi-espèce virale, d'où la persistance du HCV (Fafi-Kremer et al., 2012 ; von Hahn et al., 2007).

Le virus utilise d'autres stratégies lui permettant d'échapper au nAbs. De part sa grande variabilité génétique le HCV est capable de s'adapter parfaitement à l'environnement de son hôte (Anjum et al., 2013; Fafi-Kremer et al., 2012 ; Falkowska et al., 2007 ; Helle et al., 2010 ; Pantua et al., 2013). Plus particulièrement, la région HVR1 de E2 joue un rôle important dans la protection du HCV contre les réponses immunitaires humorales. En effet, la délétion de HVR1 augmente significativement la sensibilité des virus à la neutralisation par des anticorps monoclonaux ou par des sérums de patients (Bartosch et al., 2005 ; Vieyres et al., 2011). Ceci suggère que HVR1 pourrait masquer certains épitopes et sites de liaisons de E2 à CD81, afin d'empêcher la reconnaissance de résidus conservés par les nAbs (Bankwitz et al., 2010). Il a également été démontré que les N-glycosylations de E2 sont importantes (Helle et al., 2010). Ces glycosylations permettraient de protéger certains épitopes de E2 contre la reconnaissance par les nAbs (Helle et al., 2010).

Les capacités de transmission du HCV de cellule à cellule sont également décrites comme un mécanisme d'échappement viral (Brimacombe et al., 2011; Timpe et al., 2008). Ce mode de transmission apparaît comme plus rapide que la transmission de virus libre (Liu and He, 2013). Certains récepteurs et facteurs d'entrée du HCV, notamment OCLN, CLDN1, SR-BI et EGFR, joueraient un rôle important dans ce mode de transmission (Brimacombe et al., 2011 ; Catanese et al., 2013a ; Liu and He, 2013 ; Lupberger et al., 2008; Zahid et al., 2012). Le rôle du CD81 a été plus controversé (Brimacombe et al., 2011; Timpe et al., 2008 ; Witteveldt et al., 2009) mais l'efficacité d'anticorps anti-CD81 à bloquer la transmission de cellule à cellule est en faveur de son implication dans ce mécanisme (Brimacombe et al., 2011; Fofana et al., 2013a). Récemment, Tarr et al. ont également généré des anticorps à domaine unique (dénués de chaînes légères) chez l'alpaca (Tarr et al., 2013). Ces anticorps peuvent interférer efficacement avec la transmission du HCV de cellule à cellule (Tarr et al., 2013). La transmission du HCV de cellule à cellule reste cependant un moyen pour le virus de limiter *in vivo* sa présence dans le milieu extracellulaire, lieu propice à la neutralisation par les nAbs (Timpe et al., 2008).

Le HCV peut également infecter directement les lymphocytes B et induire des hypermutations des chaînes lourdes des immunoglobulines. Ces mutations diminuent l'affinité et la spécificité des anticorps produits (Machida et al., 2008). De plus, les lymphocytes B pourraient

jouer un rôle de transporteurs afin de transmettre le HCV aux hépatocytes (Stamataki et al., 2009). Au cours de l'infection par le HCV un taux important de LVP défectives a été mis en évidence chez plusieurs patients infectés par le HCV. Ces LVP défectueuses sont caractérisées par l'absence de nucléocapside. Ces particules pourraient participer à l'échappement viral en servant de leurre aux réponses immunitaires humorales (Scholtes et al., 2012).

Enfin, l'association virale avec les lipoprotéines pourrait également protéger le virus en masquant les épitopes viraux ainsi qu'en facilitant l'entrée virale limitant ainsi l'exposition aux nAbs (Bartosch et al., 2005 ; Fafi-Kremer et al., 2012). Le rôle réel des lipoprotéines dans l'échappement du HCV est peu connu et constitue une part importante de ce travail de thèse.

Impact de l'échappement viral au cours de la transplantation hépatique

L'échappement viral aux nAbs ne joue pas seulement un rôle dans la persistance virale au cours de l'infection chronique par le HCV mais également dans l'infection du greffon au cours de la TH (Fafi-Kremer et al., 2010). Malgré la présence d'anticorps, la réinfection du greffon a lieu dans les quelques heures suivant la transplantation. Parmi les variants viraux présents avant la TH, seule une fraction de variants est sélectionnée et va persister après la TH (Fafi-Kremer et al., 2010; Schvoerer et al., 2007). Ces variants, contrairement aux variants non-sélectionnés après TH, sont caractérisés par une entrée plus efficace dans les hépatocytes ainsi que des capacités élevées d'échappement aux nAbs (Fafi-Kremer et al., 2010). Ceci suggère qu'une entrée efficace dans les hépatocytes et la capacité d'échappement aux nAbs sont des éléments clés de la réinfection du greffon hépatique. La compréhension de ces mécanismes est nécessaire pour le développement de méthodes de prévention de la réinfection du greffon hépatique et constitue un des objectifs de ce travail de thèse.

Contexte et objectifs de la thèse

La cirrhose et le carcinome hépatocellulaire liés au HCV sont des indications majeures de TH. Malheureusement, la réinfection du greffon par le HCV est systématique et évolue rapidement vers une cirrhose chez une proportion importante de patients. A l'heure actuelle, il n'y a pas de moyens de prévention de la réinfection du greffon par le HCV. Les mécanismes par lesquels le virus échappe au système immunitaire afin de réinfecter le greffon sont mal connus.

L'unité mixte de recherche 1110 (monoéquipe) dirigée par le Pr Thomas Baumert étudie la pathogénie de l'infection par le HCV et se concentre sur l'analyse moléculaire des interactions entre le HCV et sa cellule cible. Le laboratoire du Pr Thomas Baumert utilise le contexte de la réinfection du greffon après TH comme un modèle unique d'étude des étapes précoces de l'infection par le HCV *in vivo*. Une étude réalisée sur six patients a démontré qu'au cours de la TH seule une fraction des variants viraux est sélectionnée et va réinfecter le greffon alors que les autres variants, appelés variants non-sélectionnés, ne sont pas détectés après TH. Chez le patient 1, le variant L appelé VL est le seul variant sélectionné après TH (Figure 11A) et présente une infectiosité supérieure à tous les autres variants pré-TH (ex : le variant C (VC) et le variant A (VA)) (Figure 11B). Le VL est également capable d'échapper aux nAbs présents dans le sérum autologue contrairement aux variants non-sélectionnés (Figure 11C). Ces travaux ont également permis de constituer une banque de variants viraux très bien caractérisés et représentant un outil unique pour étudier l'entrée virale et évaluer la neutralisation médiée par les anticorps.

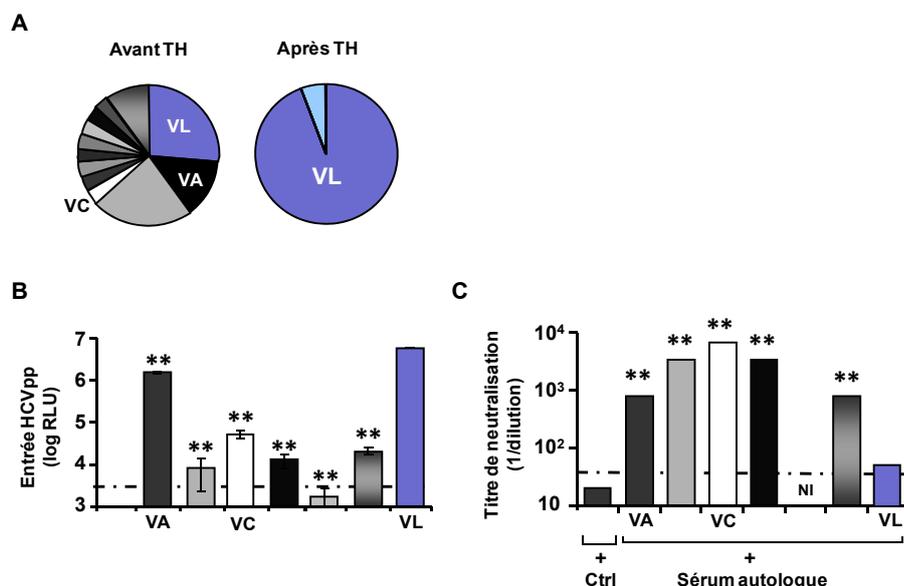


Figure 11. Caractéristiques des variants sélectionnés et non-sélectionnés après TH chez un patient. (A) Diagramme représentant la diversité virale des variants présents avant et après TH chez un patient. On note l'importante diminution de la diversité virale après TH avec la seule sélection du variant VL. (B) Infectiosité des différents variants. L'infectiosité des HCVpp portant les GPs des différents variants a été déterminée par détection de la luciférase dans les cellules Huh7.5.1 infectées. (C) Neutralisation des variants par le sérum autologue du patient. Les HCVpp portant les GPs des différents variants ont été

incubées avec différentes dilutions du sérum autologue. Le titre de neutralisation reflète l'efficacité du sérum à neutraliser les virus. *TH, liver transplantation, GPs, glycoprotéines (Fafi-Kremer et al., 2010)*

L'objectif de ma thèse d'université a été d'étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans l'efficacité d'entrée du HCV dans la cellule hôte et son échappement aux anticorps neutralisants *in vivo*. Nous avons abordé ce projet de recherche selon deux axes principaux.

Dans la première partie de ma thèse nous avons caractérisé le rôle des interactions entre le HCV et les récepteurs cellulaires, dans l'entrée virale et l'échappement aux anticorps neutralisants (**publication n°1** : Fofana I*, Fafi-Kremer S*, Carolla P*, **Fauvelle C**, Zahid MN, Turek M, Heydmann L, Cury K, Hayer J, Combet C, Cosset FL, Pietschmann T, Hiet MS, Bartenschlager R, Habersetzer F, Doffoël M, Keck ZY, Fong SK, Zeisel MB, Stoll-Keller F, Baumert TF. *Gastroenterology*. 2012 Jul ; 143(1):223-233. (*contribution équivalente)).

Une particularité unique du HCV est de circuler dans le sang sous forme de particules virales associées aux TRLs. La nature de l'association entre les lipoprotéines et le HCV ainsi que les mécanismes par lesquels cette association augmente l'infectiosité du HCV et son impact sur la physiopathologie de l'infection ne sont pas connus à ce jour.

La deuxième partie de ma thèse a ainsi consisté en une analyse fonctionnelle des lipoparticules virales, basée sur l'hypothèse que le HCV pourrait bénéficier de son association avec les lipoprotéines pour masquer ses épitopes et échapper aux anticorps neutralisants. (**Publication n°2** : Felmlee DJ*, **Fauvelle C***, Lefèvre M, Heydmann L, Hiet MS, Bartenschlager R, Fofana I, Habersetzer F, Milne R, Patel AH, Vercauteren K, Meuleman P, Zeisel MB, Schuster C, Fafi-Kremer S#, Baumert TF#. *PNAS*. 2013. Soumis. (*, # contribution équivalente)).

Ces travaux de thèse ont pour but de mieux caractériser les particules HCV et leur interactions avec les facteurs d'hôte afin d'identifier plus précisément les problèmes que pourra rencontrer la conception d'un vaccin prophylactique. De plus ces études permettront également d'identifier de nouveaux épitopes immunogènes conservés susceptibles d'être une cible vaccinale efficace.

Résultats et discussion

Partie 1 : Des mutations de l'enveloppe virale permettent de moduler simultanément l'utilisation du récepteur cellulaire CD81 et la neutralisation par les anticorps.

Publication n°1 : Mutations that alter use of hepatitis C virus cell entry factors mediate escape from neutralizing antibodies (Annexe 1).

Fofana I*, Fafi-Kremer S*, Carolla P*, **Fauvelle C**, Zahid MN, Turek M, Heydmann L, Cury K, Hayer J, Combet C, Cosset FL, Pietschmann T, Hiet MS, Bartenschlager R, Habersetzer F, Doffoël M, Keck ZY, Fong SK, Zeisel MB, Stoll-Keller F, Baumert TF. (*contribution équivalente). *Gastroenterology*. 2012 Jul ; 143(1):223-233.

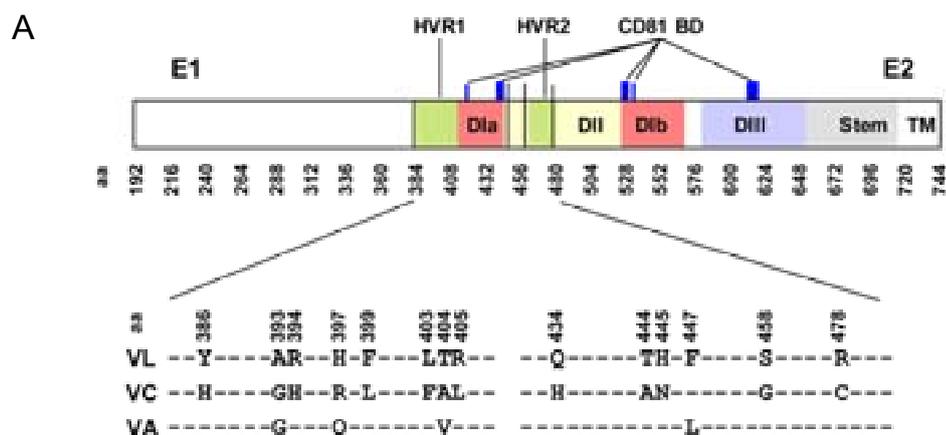
Contexte et objectifs: La prévention de l'infection par le HCV ainsi que le développement d'un vaccin sont grandement limités par les capacités d'échappement du HCV. L'entrée du HCV dans les hépatocytes est la première étape du cycle viral et nécessite un grand nombre de facteurs de l'hôte. Cette étape est une cible majeure des réponses immunitaires humores. Bien que le rôle des différents récepteurs cellulaires soit bien caractérisé, leur implication dans l'échappement viral est mal comprise. Nous avons utilisé l'infection aiguë du greffon hépatique comme modèle d'étude des mécanismes moléculaires de l'échappement viral. Méthodes : Afin d'étudier les facteurs qui contribuent à l'échappement du HCV aux réponses immunitaires de l'hôte, nous avons généré des pseudoparticules et des virus recombinants infectieux HCV portant les GPs de variants identifiés chez un patient avant et après TH. Des lignées hépatocytaires exprimant de manière plus ou moins forte les différents facteurs d'entrée du HCV ont été infectées. Des tests de neutralisation ont été effectués avec du sérum autologue du patient ainsi que des sérums d'une cohorte de patients chroniquement infectés par le HCV. Résultats : Nous avons identifié que le HCV module son utilisation des facteurs d'entrée cellulaires afin d'échapper aux réponses immunitaires de l'hôte. Plus précisément, des mutations qui modifient l'utilisation du récepteur CD81 permettent notamment au HCV d'échapper aux nAbs. L'utilisation d'un large panel d'Abs provenant de patients chroniquement infectés par le HCV démontre que ce mécanisme est valable dans le contexte de l'infection chronique en général. Conclusions : Nous avons identifié des mutations au niveau de la GP E2, qui permettent au virus non seulement d'échapper aux nAbs mais également d'utiliser différemment les récepteurs cellulaires tel que le CD81. Cette évolution doublement favorable permet au HCV d'optimiser les premières étapes de l'infection et de favoriser sa persistance. Ces résultats permettent une meilleure compréhension de l'infection par le HCV et sont utiles dans l'élaboration de nouvelles stratégies antivirales et vaccinales.

I. Résultats

La première partie de mon travail de thèse est en continuité avec l'étude réalisée par Fafi-Kremer *et al.* et publiée en 2010 dans le *Journal of Experimental Medicine* (Fafi-Kremer *et al.*, 2010). L'objectif de notre étude a été de comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans l'efficacité d'entrée et l'échappement viral des variants réinfectant le foie après TH. Pour cela, nous avons utilisé les variants VL, VC et VA du patient 1 (P1) (Fafi-Kremer *et al.*, 2010).

Les résidus F447, S458 et R478 de E2 confèrent une infectiosité élevée au VL

Fafi-Kremer *et al.* ont mis en évidence le rôle de la région 425-483 de E2 dans le phénotype d'entrée du VL (Fafi-Kremer *et al.*, 2010). L'alignement des séquences en acides aminés du VL et des variants non-sélectionnés VC et VA a montré plusieurs résidus différents entre eux (Figure 12A). L'étude détaillée par mutagenèse dirigée du rôle de chacun de ces acides aminés, a permis d'identifier que les résidus F447, S458 et R478 étaient responsables de l'entrée efficace du VL. En effet alors que le VC présente une infectiosité de 5% par rapport à celle du VL, l'introduction combinée des résidus S458 et R478 du VL dans le VC (VCVL₄₅₈₊₄₇₈) restaure son infectiosité (Figure 12B). A l'inverse l'introduction des résidus G458 et C478 du VC dans le VL (VLVC₄₅₈₊₄₇₈) affecte largement ses capacités d'entrée dans les cellules. De plus, sur le VA, un autre variant non-sélectionné, nous avons démontré que le résidu 447 joue également un rôle majeur dans l'infectiosité du variant sélectionné VL (Figure 12B). Alors que le VA est environ trois fois moins infectieux que le VL, l'introduction du résidu F447 (VAVL₄₄₇) restaure complètement son infectiosité au niveau de celle du VL parental, et inversement.



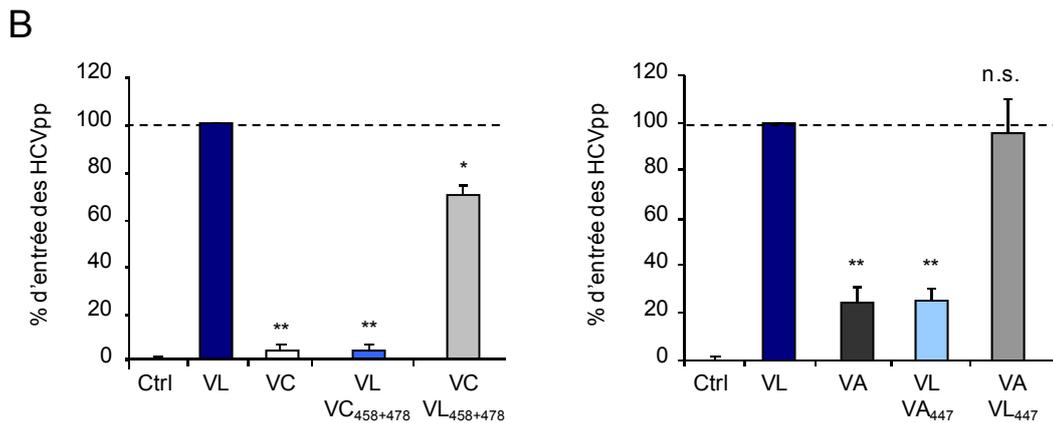


Figure 12. Les résidus 447, 458 et 478 confèrent l'efficacité d'entrée du variant VL. (A) Organisation génomique et mutations de la GP E2 du variant sélectionné VL et des variants non-sélectionnés VC et VA. Les régions HVR1 et HVR2 sont représentées en vert, les domaines de E2 en rouge (DI), jaune (DII) et violet (DIII). Les domaines de liaison au CD81 sont représentés par des barres bleues. (B) Entrée virale des différentes HCVpp parentales et chimères dans les cellules Huh7.5.1. L'infection est déterminée par analyse de l'expression de gène de la luciférase. Les résultats sont exprimés en tant que % d'entrée comparé au VL. La moyenne et les écarts-types de 4 expériences réalisées en triplicats sont représentés. * $p < .05$, ** $p < .001$. aa, acide aminé, BD, domaine de liaison, HVR, région hypervariable, ns, non-significatif.

Une utilisation différentielle du récepteur CD81 explique l'entrée virale élevée du variant VL

Le modèle structural de la GP E2 décrit par Krey et al. montre que les résidus F447, S458 et R478 sont situés à proximité étroite des sites de liaison au récepteur CD81 (Krey et al., 2010). Nous avons donc étudié si ces mutations pouvaient modifier l'utilisation du récepteur CD81. Pour cela nous avons produit des cellules Huh7.5 surexprimant le récepteur CD81 et testé l'entrée des HCVpp parentales et chimères dans ces cellules. Nous avons observé que la surexpression de CD81 augmente l'entrée du VL et du VC dans ces cellules. L'entrée du VL dans ces cellules est cependant augmentée de façon plus importante que le VC (3,2 fois vs 2 fois) (Figure 13A). L'introduction des résidus S458 et R478 du VL dans le VC (VCVL₄₅₈₊₄₇₈) permet au variant chimère d'augmenter son utilisation du récepteur CD81 alors qu'à l'inverse l'introduction des résidus G458 et C478 du VC dans le VL (VLVC₄₅₈₊₄₇₈) la diminue (Figure 13A). Ces résultats suggèrent que la combinaison de ces deux mutations affecte l'entrée virale en modulant la dépendance au récepteur CD81. Afin de déterminer si cette observation est spécifique du récepteur CD81 ou bien si ces résidus peuvent également moduler l'usage d'autres récepteurs du HCV, nous avons produit des cellules Huh7.5 surexprimant les récepteurs SR-BI, CLDN et OCLN. La surexpression de SR-BI augmente également l'entrée virale de VL et VC. Cependant cette augmentation n'est pas liée aux résidus 458 et 478 mais implique probablement d'autres résidus (Figure 13A). La surexpression de CLDN1 ou OCLN ne modifie pas de manière significative l'entrée des variants VL et de VC (Figure 13A).

Afin de confirmer l'importance de l'utilisation du CD81 par le VL ainsi que l'implication des résidus F447, S458 et R478, nous avons utilisé des cellules dans lesquelles l'expression de CD81 a été diminuée par l'introduction d'un shARN dirigé contre le CD81. Dans ces cellules le VL présente une plus forte diminution d'entrée en comparaison des variants VC et VA (5,4 fois vs 4,3 et 2,9 fois respectivement) (Figure 13B). L'introduction du résidu F447 du VL dans le VA (VAVL₄₄₇) ainsi que les résidus S458 et R478 du VL dans le VC (VCVL₄₅₈₋₄₇₈) confère aux HCVpp chimères le phénotype d'entrée du VL dans ces cellules (Figure 13B). Afin de déterminer si les mutations des résidus 447, 458 et 478 modifiaient les capacités d'interactions entre les GP et le CD81, nous avons incubé des cellules Huh7.5 shCtrl et shCD81 avec les GPs E1E2 des variants parentaux et chimères. Après immunomarquage de E2, la liaison des GPs aux cellules a été analysé par cytométrie en flux. Nous avons pu démontrer que le VL se lie moins efficacement aux cellules shCD81 que le VC et le VA et que l'échange des résidus identifiés confère le phénotype du variant parental (Figure 13C). Ensemble ces résultats indiquent que les mutations F447, S458 et R478 modulent les capacités de liaison des GPs avec le CD81 cellulaire. Ces données confirment que le variant d'échappement VL utilise différemment le récepteur CD81 et que cette différence d'utilisation est dépendante des trois résidus aux positions 447, 458 et 478.

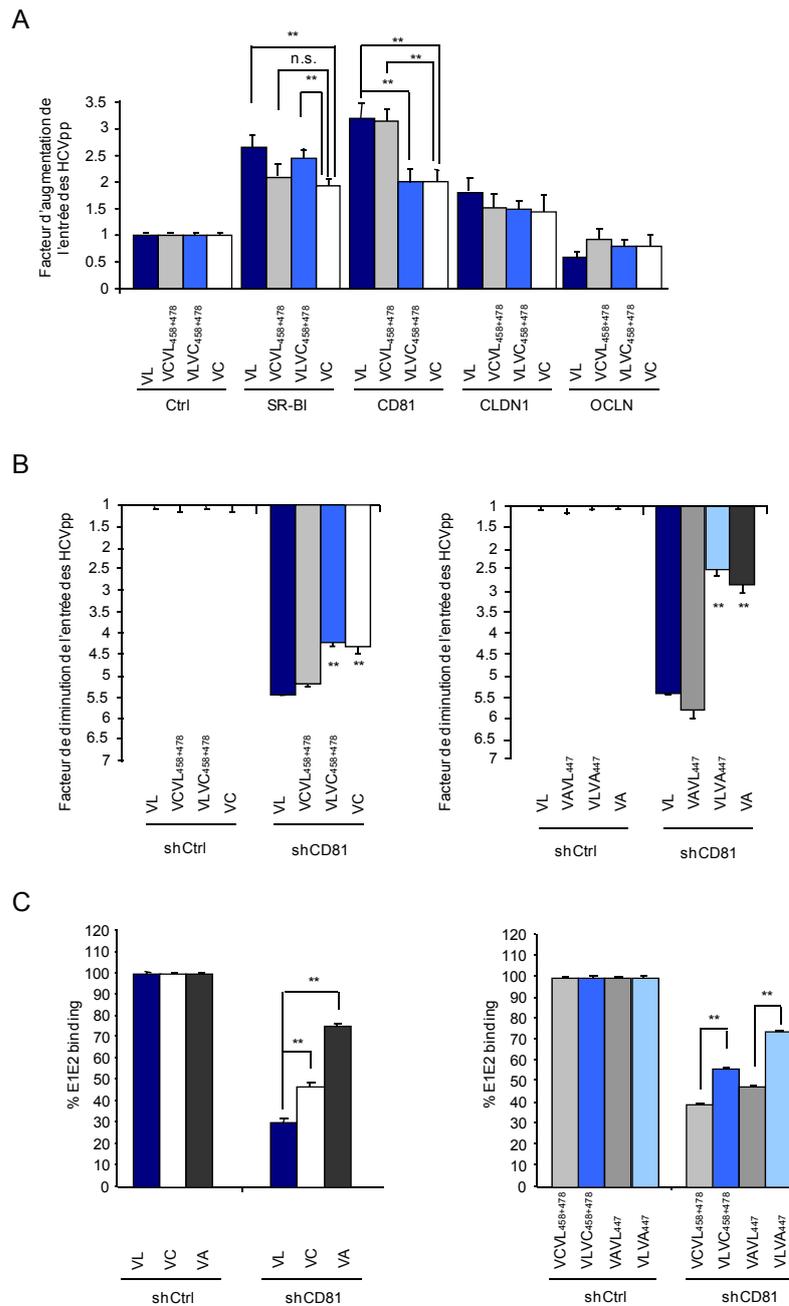


Figure 13. Une utilisation différentielle du récepteur CD81 explique l'entrée virale élevée du variant VL. (A) Entrée virale des différentes HCVpp parentales et chimères dans des cellules Ctrl et des cellules surexprimant le récepteur CD81. L'entrée virale est exprimée en tant que facteur d'augmentation de l'entrée virale des HCVpp en comparaison de l'entrée dans les cellules contrôles. La moyenne et les écarts-types de 3 expériences réalisées en triplicats sont représentés. **** $p < .001$.** **(B)** Entrée virale des différentes HCVpp parentales et chimères dans des cellules contrôles (shCtrl) et des cellules ayant une expression diminuée du récepteur CD81 (shCD81). L'entrée virale est exprimée en tant que facteur de diminution de l'entrée virale des HCVpp en comparaison de l'entrée dans les cellules contrôles. La moyenne et les écarts-types de 3 expériences réalisées en triplicats sont représentés. **** $p < .001$.** **(C)** Liaison des GPs E1E2 aux cellules Huh7.5 shCtrl et shCD81 détectée par cytométrie en flux. Les résultats sont exprimés comme pourcentage de liaison de E1E2 par rapport à leur liaison aux cellules Huh7.5 shCtrl. La moyenne et les écarts-types de 3 expériences réalisées en triplicats sont représentés. **** $p < .001$.**

Les résidus F447, S458 et R478 participent à l'échappement du VL aux anticorps présents dans le sérum autologue

Nous avons ensuite évalué si les résidus identifiés dans la région E2₄₂₅₋₄₈₃ jouaient également un rôle dans le phénotype d'échappement à la neutralisation du VL. Les HCVpp des variants parentaux VL, VC et VA ainsi que les variants chimères ont été incubées durant 1h avec du sérum autologue à différentes dilutions. Après une infection de 72h sur des cellules Huh7.5.1 le titre de neutralisation a été déterminé. Les résultats montrent que le VL échappe aux nAbs présents dans le sérum autologue alors que les variants VC et VA sont hautement neutralisés (Figure 14). Nous avons également observé que les HCVpp chimères VLVC₄₅₈₊₄₇₈ et VLVA₄₄₇ sont sensibles à la neutralisation. Ces résultats indiquent que les résidus F447, S458 et R478 sont à la fois responsables de l'entrée efficace du VL dans les cellules ainsi que de ses capacités d'échappement aux nAbs.

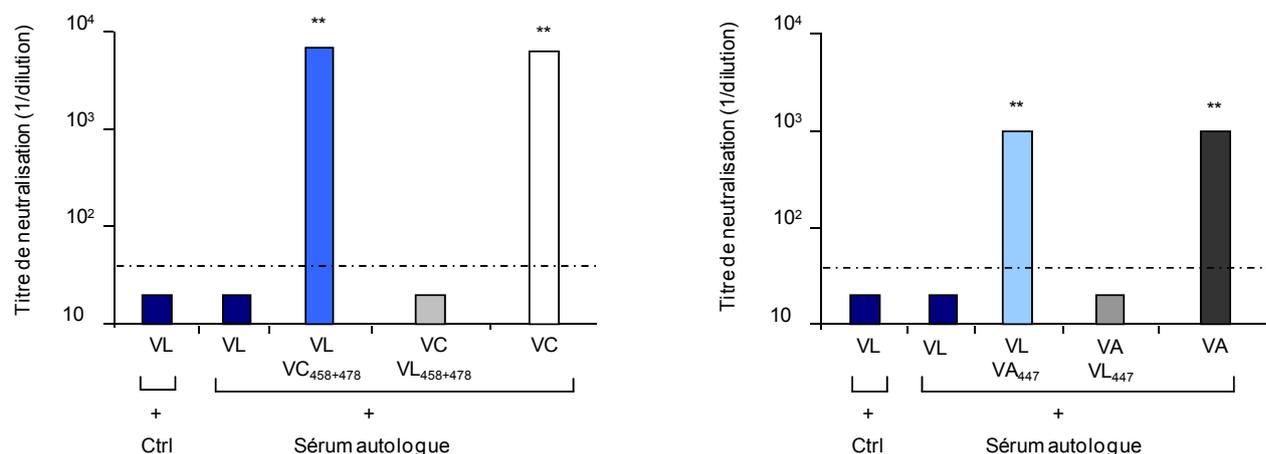


Figure 14. Les résidus F447, S458 et R478 participent à l'échappement aux anticorps neutralisants dans le sérum autologue. Neutralisation des différentes HCVpp parentales et chimères par les anticorps neutralisants présents dans le sérum autologue. Les cellules Huh7.5.1. sont infectées par des HCVpp pré-incubées au-préalable avec le sérum aux différentes dilutions pendant 1h à 37. Les résultats sont exprimés en titre de neutralisation. La ligne discontinue représente la limite à partir de laquelle la neutralisation est considérée comme positive (titre de 1/40). ** $p < .001$.

Les résidus F447, S458 et R478 participent à l'échappement du VL aux anticorps de patients infectés de manière chronique

Nous avons également étudié si ces résidus en plus de jouer un rôle majeur dans l'échappement aux nAbs dans le sérum autologue, pouvaient également être impliqués dans l'échappement aux nAbs en général. Pour cela nous avons testé les capacités de neutralisation de sérums collectés chez une cohorte de patients chroniquement infectés par le HCV sur les HCVpp parentales et chimères. Le VL échappe à la neutralisation de 53 des 102 sérums testés avec un titre moyen de neutralisation de 1/144 (Figure 15). A l'inverse les variants VC et VA sont neutralisés

respectivement par 90 et 80 des 102 sérums avec un titre moyen de neutralisation de 1/1088 et 1/322. Ces résultats confirment le rôle joué par les résidus F447, S458 et R478 dans l'échappement du VL à la neutralisation par les nAbs.

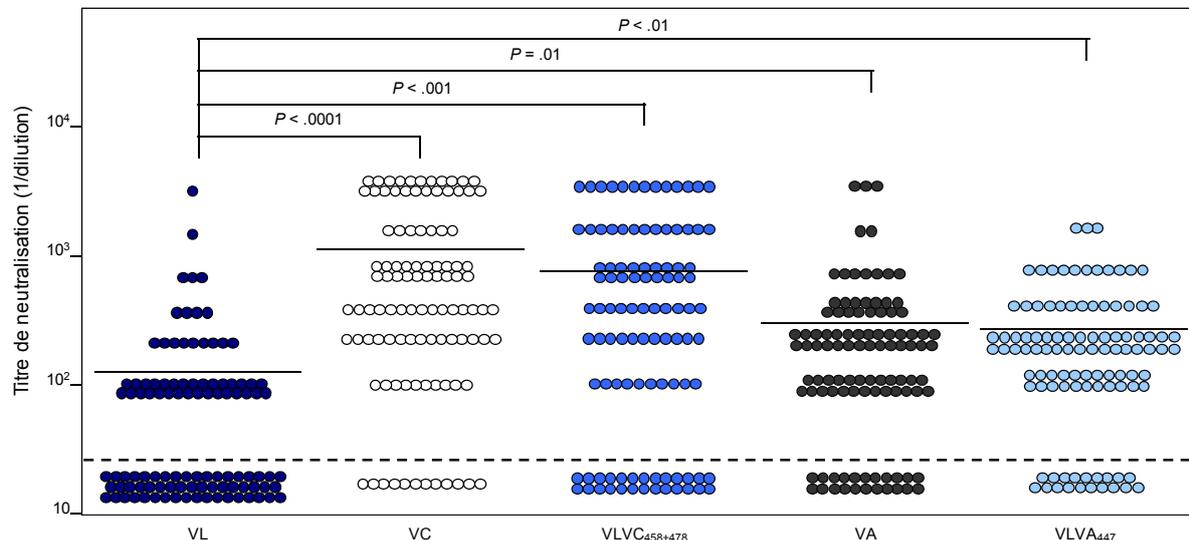


Figure 15. Les résidus F447, S458 et R478 participent à l'échappement aux anticorps neutralisants de patients chroniquement infectés. Neutralisation des différentes HCVpp parentales et chimères par 103 sérums hétérologues. Les cellules Huh7.5.1. sont infectées par des HCVpp pré-incubées au-préalable avec les différents sérums aux différentes dilutions pendant 1h à 37. Les résultats sont exprimés en titre de neutralisation. La ligne discontinue représente la limite à partir de laquelle la neutralisation est considérée comme positive (titre de 1/40). Les lignes horizontales représentent le titre moyen de neutralisation.

L'implication des résidus 447, 458 et 478 dans la modulation de l'utilisation du récepteur CD81 ainsi que dans l'échappement au nAbs est confirmée en modèle HCVcc

Afin de démontrer la pertinence de nos données, nous avons confirmé nos résultats principaux dans le modèle d'étude HCVcc. En collaboration avec l'équipe du Pr. Bartenschlager de l'université de Heidelberg, un HCVcc chimère a été construit (VL HCVcc), en remplaçant dans le génome du variant JFH1 les séquences allant de core au premier domaine transmembranaire de NS2 par les séquences du variant d'échappement VL. Les mutations L447, G458 et C478 identifiées dans cette étude ont ensuite été insérées par mutagenèse dirigée dans la séquence de la GP E2 du VL-JFH1. Les résultats obtenus ont permis de confirmer l'importance de ces résidus à la fois dans l'entrée virale, dans l'utilisation du récepteur CD81, ainsi que dans l'échappement du HCV aux nAbs (Figure 16).

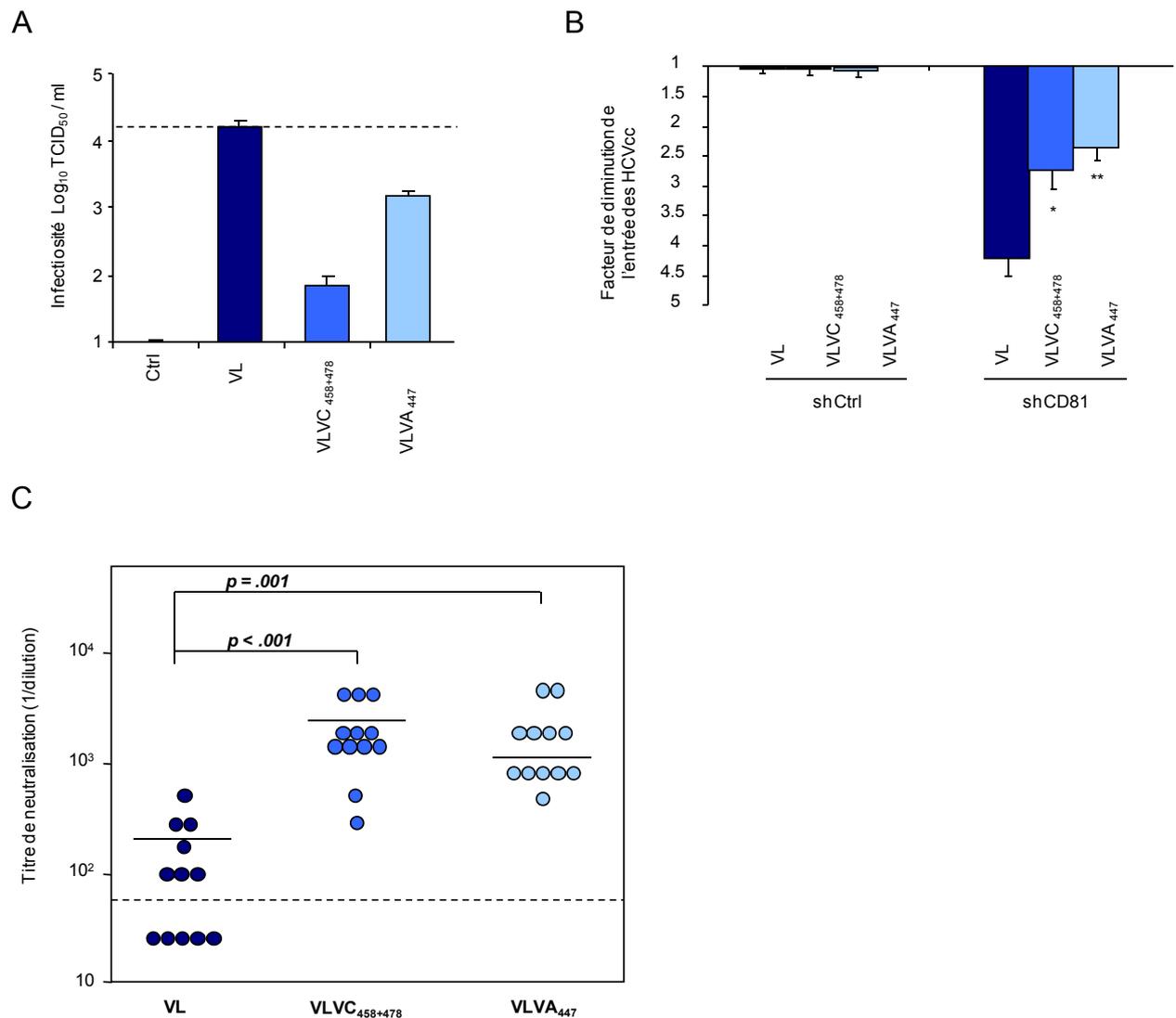


Figure 16. Entrée virale et échappement à la neutralisation des HCVcc chimères. (A) Infectiosité des HCVcc VL, VLVC₄₅₈₊₄₇₈ et VLVA₄₄₇ obtenues par dilutions en série (TCID₅₀/ml). (B) Entrée virale des différents HCVcc dans des cellules contrôles (shCtrl) et des cellules ayant une expression diminuée du récepteur CD81 (shCD81). L'entrée virale est exprimée en tant que facteur de diminution de l'entrée virale des HCVpp en comparaison de l'entrée dans les cellules contrôles. La moyenne et les écarts-types de 3 expériences réalisées en triplicats sont représentés. * $p < .05$, ** $p < .001$. (C) Neutralisation des différents HCVcc par 12 sérums hétérologues. Les cellules Huh7.5.1. sont infectées par des HCVcc pré-incubées au préalable avec les différents sérums aux différentes dilutions pendant 2h à température ambiante. Les résultats sont exprimés en titre de neutralisation. La ligne discontinue représente la limite à partir de laquelle la neutralisation est considérée comme positive (titre de 1/40). Les lignes horizontales représentent le titre moyen de neutralisation.

II. Discussion

Le HCV circule chez le patient sous forme de quasi-espèce. Von Hahn et al. ont montré que les nAbs produits par le système immunitaire de l'hôte sont constamment en décalage par rapport à l'évolution rapide des séquences des GPs des quasi-espèces (von Hahn et al., 2007). Cette évolution continue et rapide des séquences des GPs et de la spécificité des nAbs indique qu'une importante pression de sélection est mise en place et influe sur l'évolution du HCV. La présence simultanée de variants différents, permet une sélection rapide des mutants les mieux adaptés aux variations de l'environnement de l'hôte. Cependant, cette évolution constante des séquences des GPs du HCV compromet en même temps l'infectiosité virale. En effet des mutations qui permettent au HCV d'échapper aux nAbs ont été décrites dans le DII de E2 (Keck et al., 2009). Cependant ces mutations réduisent également les capacités d'entrée dans les hépatocytes du HCV en diminuant sa liaison au CD81 (Keck et al., 2009).

Dans notre étude, nous avons identifié des mutations dans la séquence de la GP E2 du HCV qui permettent au virus d'échapper aux nAbs et d'entrer plus efficacement dans les hépatocytes. Nous avons également montré que ces deux mécanismes sont liés à une modulation de l'utilisation du récepteur CD81. La co-évolution de l'utilisation des facteurs de l'hôte et de l'échappement viral permet au HCV d'optimiser les premières étapes de l'infection et de favoriser sa persistance. Le variant VL est capable d'échapper aux nAbs autologues mais également de résister aux nAbs de patients hétérologues chroniquement infectés par le HCV. Ce nouveau mécanisme joue probablement un rôle important dans l'échappement viral au cours de la TH, mais également dans l'échappement viral lors d'une infection par le HCV en général.

Dans le modèle structural de E2 proposé par Krey et al., les résidus 447, 458 et 478 sont situés à proximité des domaines de liaison connus au CD81 (Figure 17) (Krey et al., 2010). Roccasecca et al. ont également démontré que les HVRs de E2 joueraient un rôle dans la modulation de la liaison de E2 au récepteur CD81 (Roccasecca et al., 2003). Or le résidu 478 fait partie intégrante de HVR2 et le résidu 447 est situé à proximité d'un motif conservé entre HVR1 et HVR2 de E2. Ce motif est impliqué dans la reconnaissance du CD81. (Drummer et al., 2006). La mutation des résidus 447, 458 et 478 affecte les capacités de liaison des GPs au CD81. Ces résidus peuvent donc moduler la dépendance du HCV au CD81 et participent également à l'échappement viral aux nAbs. Il est probable que ces résidus fassent partie d'un ensemble de boucles extracellulaires exposées et impliquées directement dans des liaisons E2-CD81. Ces résidus pourraient également jouer un rôle pour des réarrangements structuraux nécessaires à l'entrée virale.

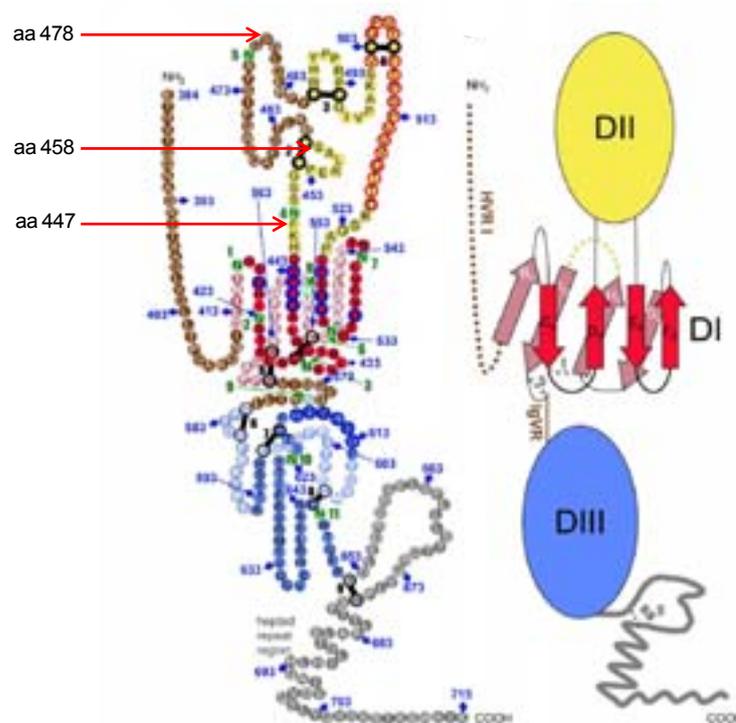


Figure 17. Localisation des résidus 447, 458 et 478 dans le modèle structural de la glycoprotéine d'enveloppe E2. Séquence linéaire de E2 de la souche HCV H77. Les ponts disulfures et les sites de glycosylation sont représentés par des barres noires épaisses et des ronds verts respectivement. Les résidus impliqués dans la liaison au CD81 sont encerclés en bleu. Le DI de E2 est représenté en rouge/rose et le DII et DIII en jaune et bleu respectivement. La localisation des différents résidus est représentée par des flèches rouges (Krey et al., 2010).

De nombreux anticorps monoclonaux interférant dans la liaison de E2 au CD81 ont été décrits. Parmi ces anticorps, plusieurs ciblent des épitopes de E2 situés à proximité des résidus 447, 458 et 478 identifiés dans cette étude (Flint et al., 1999 ; Keck et al., 2012 ; Keck et al., 2013 ; Keck et al., 2004 ; Keck et al., 2005 ; Keck et al., 2008 ; Krey et al., 2013 ; Hsu et al., 2003 ; Owsianka et al., 2008 ; Law et al., 2008) (Figure 18). Nos résidus appartiennent donc à une région importante et immunogène de E2. L'identification chez le variant VL sélectionné après TH de nouveaux résidus favorisant les interactions avec le CD81 et participant à l'échappement aux nAbs confirme l'importance de cette région de E2. Nos résultats renforcent également l'idée que cette région représente une bonne cible vaccinale.

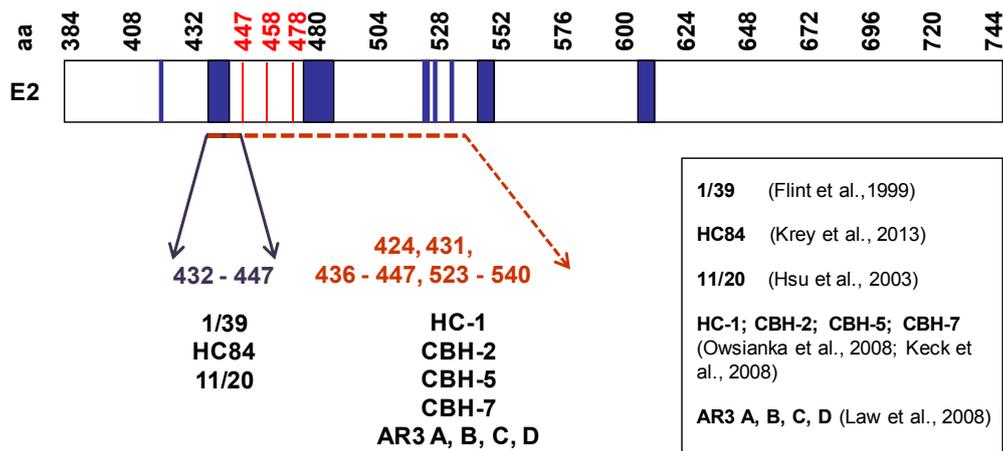


Figure 18. Domaines de liaison de E2 au CD81 et anticorps neutralisant. Représentation de la GP E2 et des domaines de liaison connus de E2 au CD81 (rectangles bleus). Les résidus 447, 458 et 478 sont indiqués par des lignes rouges. Les épitopes ciblés par les principaux anticorps neutralisant ayant un effet sur la liaison E2-CD81 et se trouvant à proximité des résidu 447, 458 et 478 sont indiqués.

Les résidus sérine 458 et arginine 478 du variant VL peuvent former des interactions avec d'autres résidus. Ces interactions pourraient augmenter la stabilité des interactions E2-CD81 et la formation du complexe E2-CD81-CLDN1, et être à l'origine de l'entrée efficace du VL (Harris et al., 2010). Les résidus S458 et R478 pourraient également augmenter l'hydrophilicité de la boucle à laquelle ils appartiennent. Ceci favoriserait l'exposition des résidus et pourrait moduler les interactions entre E2 et CD81 et bloquer la liaison des nAbs à leur épitope.

Le résidu leucine 447 du variant VA au lieu du résidu phénylalanine 447 du VL ne semble pas perturber la structure de E2. Cependant la présence d'une leucine pourrait augmenter l'hydrophobicité de E2 et limiter son accessibilité, réduisant ainsi les capacités d'interaction de E2 avec CD81 ou la formation du complexe E2-CD81-CLDN1.

Nos résultats ont identifié de nouveaux déterminants clés dans l'échappement viral. Bien qu'actuellement plusieurs anticorps monoclonaux ou polyclonaux anti-E2 soient en développement pour leur capacité à prévenir l'infection par le HCV (Law et al., 2008); (Vanwolleghe et al., 2008), de nombreux variants comme le VL ont prouvé leurs importantes capacités d'échappement aux nAbs. L'identification de nouveaux facteurs viraux et cellulaires impliqués dans l'échappement viral chez les patients apporte de nouvelles perspectives dans le développement d'une nouvelle génération de nAbs capables de surmonter l'échappement viral.

Partie 2 : L'apolipoprotéine E joue un rôle majeur dans l'échappement du HCV à la réponse humorale.

Publication n°2 : Apolipoprotein E association with hepatitis C virus particles mediates evasion from host immunity (Annexe 2).

Felmler DJ *, Fauvelle C*, Lefèvre M, Heydmann L, Hiet MS, Bartenschlager R, Fofana I, Habersetzer H, Milne R, Patel AH, Vercauteren K, Meuleman P, Zeisel MB, Schuster C, Fafi-Kremer S#, Baumert TF# (**#contribution équivalente)

Résumé

Le développement d'un vaccin et d'approches immunopréventives contre le HCV est grandement limité par les capacités du virus à échapper à l'immunité de l'hôte. Une particularité unique du HCV est l'association des virions avec les TRLs. Cette association facilite les interactions entre le virus et certains facteurs cellulaires nécessaires à l'entrée virale. Dans cette étude, nous avons examiné le rôle des lipoprotéines dans l'échappement du HCV aux réponses immunitaires humorales. En utilisant l'infection aiguë du greffon après TH comme modèle clinique, nous avons démontré que dans son association avec les TRLs, le HCV utilise spécifiquement apoE pour échapper aux nAbs. Des études fonctionnelles permettant de moduler l'expression des apolipoprotéines a effectivement démontré qu'apoE est un composant clé des lipoparticules virales intervenant dans l'échappement du HCV aux nAbs. Nous avons également identifié un résidu de la GP E2 impliqué dans la dépendance à apoE et capable de moduler les interactions HCV-apoE. Nos résultats ont permis d'identifier un nouveau rôle d'apoE dans l'échappement et la persistance virale. Cette découverte démontre que l'interaction virus-lipoprotéines est un mécanisme unique d'échappement viral et suggère que certains composants critiques des lipoprotéines devraient être intégrés dans le développement de nouveaux candidats vaccins.

I. Résultats

Afin de comprendre le rôle de l'association du HCV avec les TRLs dans la persistance virale, nous avons utilisé le variant VL (Fafi-Kremer et al., 2010 ; Fofana et al., 2012) et étudié son profil d'association aux lipoprotéines en comparaison des souches couramment utilisées au laboratoire. L'association virale avec les lipoprotéines de différentes tailles et composition lipidiques, peut être distinguée en fonction de leur profil de densité. Les virus sont fractionnés sur un gradient de densité et la proportion de particules infectieuses dans chaque fraction est testée par une technique de dilution limite (TCID₅₀) ou bien par qRT-PCR.

Le VL s'associe aux lipoprotéines riches en triglycérides pour échapper aux anticorps neutralisants

L'analyse du profil de densité du VL (chimère VL/JFH1, génotype 1b/2a) révèle une distribution des particules virales infectieuses différente en comparaison du variant couramment utilisé Jc1 (chimère J6/JFH1, génotype 2a/2a). En effet, le VL est distribué en deux pics avec une proportion importante dans les fractions de très basses densités (fractions 1-3, $d < 1.05$ g/ml), représentant les virus associés aux TRLs (Figure 19A). La comparaison de ce profil avec celui du variant chimère Jc1 montre que le VL a significativement plus de particules infectieuses réparties dans les fractions de faibles densités que le Jc1 (Figure 19B). Ces résultats indiquent que l'association aux TRLs est en partie dépendante des variants utilisés.

Nous avons ensuite étudié si la capacité d'échappement du VL aux nAbs (Fafi-Kremer et al., 2010 ; Fofana et al., 2012) pouvait être liée à cette association particulière avec les TRLs. Après fractionnement des virus, nous avons incubé les différentes fractions avec un sérum hétérologue d'un patient chroniquement infecté par un HCV de génotype 1b avant d'infecter des cellules Huh7.5.1. Seuls les virus distribués dans les gradients de densité d'environ 1.03 g/ml (correspondant à des virus associés aux TRL) sont capables d'échapper efficacement à la neutralisation par le sérum (Figure 19C). Afin d'évaluer si ce mécanisme d'échappement viral est également observé en utilisant des nAbs induits lors d'une infection par un HCV d'un autre génotype, nous avons réalisé les mêmes expériences en utilisant un sérum d'un patient chroniquement infecté par un HCV génotype 3a. Nous avons obtenu un profil d'échappement similaire à celui obtenu avec le sérum du patient avec une infection par un HCV génotype 1b (Figure 19C). Ceci démontre que les TRL jouent un rôle dans l'échappement viral quel que soit le génotype HCV. Nos résultats démontrent que l'association du HCV avec les lipoprotéines est probablement une stratégie importante dans l'échappement aux nAbs.

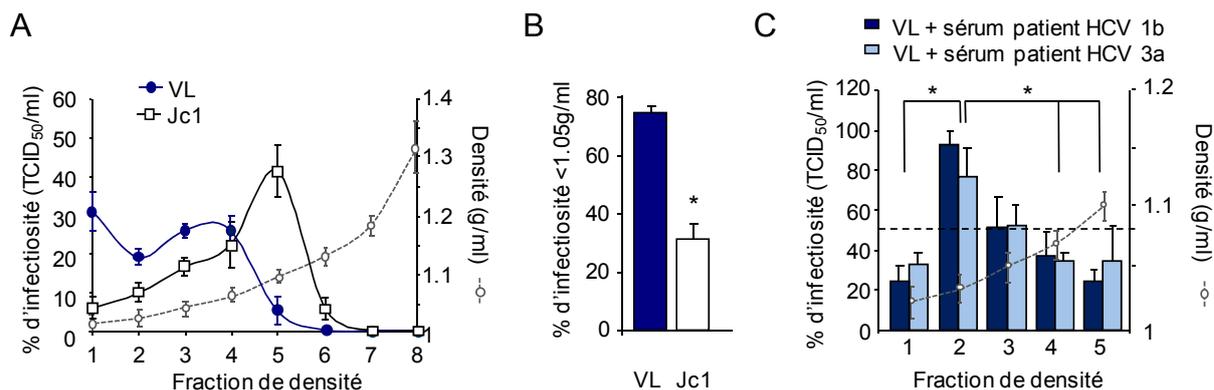


Figure 19 Le variant VL s'associe à des lipoprotéines riches en triglycérides pour échapper aux anticorps neutralisant. Les HCVcc ont été obtenus après électroporation des cellules Huh7.5.1 avec l'ARN HCV puis ultracentrifugés sur gradient d'iodixanol. **(A)** Chaque fraction récoltée a été testée pour son infectiosité par technique de dilution limite. La moyenne et les SEM de 3 expériences sont représentés. Les infectiosités des virus sont représentées par des lignes bleues avec des ronds (VL) et des lignes noires avec des carrés (Jc1) **(B)** Histogramme représentant le % de particules virales infectieuses réparties dans les fractions de faible densité (>1.05g/ml). La moyenne et les SEM de 3 expériences sont représentés. * p<0,05 **(C)** Des expériences de neutralisation des HCVcc du VL ont été réalisées sur les fractions 1 à 5. Les fractions ont été incubées avec un sérum de patient chroniquement infecté par un génotype 1b ou 3a, ou bien par un sérum contrôle (patient non-infecté) à la dilution 1/400^{ème}. Les résultats sont exprimés en tant que pourcentage d'infectiosité relatif à la fraction incubée avec le sérum contrôle. La moyenne et les SEM de 3 expériences sont représentés. * p<0,05

L'apolipoprotéine E joue un rôle central dans l'échappement viral

Afin d'étudier le mécanisme par lequel l'association du HCV avec les TRL permet la persistance virale, nous avons examiné le rôle d'apoE. Il a été démontré qu'apoE est associée aux particules virales et aux TRLs, et est impliquée dans l'infection virale par le HCV (Catanese et al., 2013b; Merz et al., 2011). Afin de déterminer si l'apoE joue un rôle dans la persistance virale, les cellules ont été co-électroporées avec l'ARN du variant VL et avec un siARN ciblant le mRNA d'apoE et permettant de diminuer l'expression de la protéine. L'efficacité de cette inhibition d'expression d'apoE est présentée en Figure 20. La diminution de l'expression d'apoE réduit d'environ 2 fois la quantité de particules virales infectieuses générées, et ces mêmes particules virales sont 10 fois plus sensibles à la neutralisation (Figure 20). Ces résultats indiquent qu'apoE n'est pas seulement importante pour l'infection et la production virale mais joue également un rôle clé dans l'échappement aux nAbs.

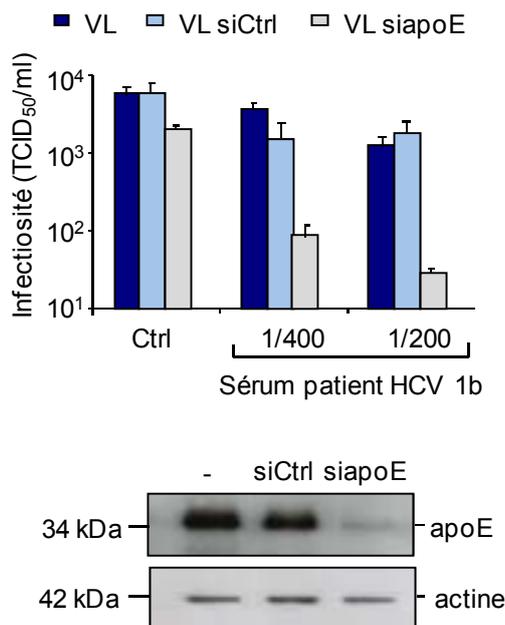


Figure 20. L'apolipoprotéine E joue un rôle central dans l'échappement viral. Les cellules Huh7.5.1 ont été électroporées avec l'ARN de VL seul ou bien co-électroporées avec l'ARN de VL et un siARN contrôle (siCTRL) ou bien avec un siARN ciblant le mRNA d'apoE (siapoE). Le milieu de culture a été remplacé 4h et 24h après électroporation. 72h après électroporation, les virus ont été récoltés et la diminution de l'expression d'apoE a été confirmée à partir des lysats cellulaires par immunoblot. L'actine a été utilisée comme contrôle de charge. Le graphique représente l'infectiosité des différents virus ainsi que l'effet neutralisant d'un sérum de patient infecté par un HCV génotype 1b. Les résultats sont exprimés en log₁₀ (TCID₅₀/ml). Les moyennes et les SEM de trois expériences réalisées sont représentés.

Implication d'apoE dans la transmission du HCV de cellule à cellule

La transmission du HCV de cellule à cellule a été proposée comme un mécanisme permettant au virus d'échapper aux nAbs en évitant le passage par le compartiment intravasculaire (Brimacombe et al., 2011; Timpe et al., 2008). Afin d'étudier si apoE est importante pour ce mode de transmission virale, nous avons utilisé un anticorps anti-apoE (1D7) qui reconnaît le domaine de liaison d'apoE au LDL-R (Weisgraber et al., 1986). De par son association différente avec les TRL, nous avons également comparé la transmission cellule à cellule du variant VL avec celle bien étudiée du Jc1 (Figure 21A). Nous avons démontré que le Jc1 a une capacité de transmission de cellule à cellule 3 fois supérieure à celle du VL (Figure 21A). Un anticorps anti-CD81 (Fofana et al., 2013a) inhibe fortement la transmission des virus VL et Jc1 (70-80%). Bien que l'anticorps 1D7 soit capable d'inhiber l'infection des cellules par le virus libre, il n'a pas d'effet sur la transmission virale de cellule à cellule du VL et du Jc1 (Figure 21B-C). Ces données indiquent qu'apoE joue un rôle prédominant dans l'infection des cellules par le virus libre.

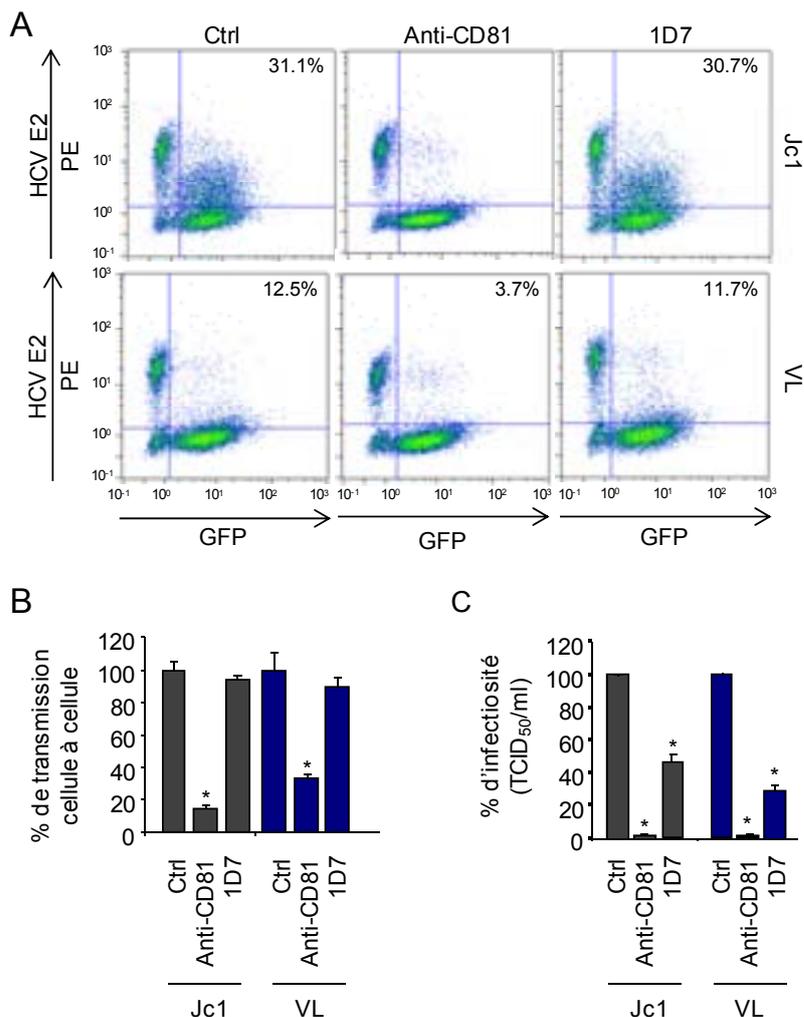


Figure 21. Implication d'apoE dans la transmission du HCV de cellule à cellule. (A) Interférence de la transmission cellule à cellule des virus Jc1 et VL par l'anticorps anti-apoE 1D7, une IgG non spécifique (Ctrl) ou un anti-CD81 comme contrôle positif (Fofana et al., 2013a). Des cellules exprimant la GFP sont co-cultivées avec des cellules productrices de HCV en présence d'un anticorps neutralisant (AP33) afin de bloquer la transmission du virus par voie extracellulaire (Fofana et al., 2013a ; Lupberger et al., 2011 ; Owsianka et al., 2005). Les résultats représentatifs d'analyses par cytométrie de flux sont présentés : l'axe y représente la quantité de cellules marquées positives pour la protéine E2 du HCV et l'axe x représente le niveau d'expression de GFP dans les cellules. **(B)** Histogrammes des résultats de transmission de cellule à cellule pour les virus Jc1 et VL. Les valeurs représentent le pourcentage de transmission cellule à cellule par rapport au contrôle. Les résultats de 3 expériences indépendantes réalisées en duplicats sont présentés. **(C)** La capacité des anticorps à inhiber l'infection par le HCV a été testée après incubation des virus avec les anticorps respectifs puis infection de cellules Huh7.5.1 naïves. Les valeurs ont été normalisées par rapport aux résultats obtenus avec le contrôle IgG (Ctrl). Les moyennes et écart-types de 3 expériences sont représentés. * $p < 0,01$

Le résidu 447 de la glycoprotéine E2 module les interactions entre l'apoE et le HCV

Dans la partie I de cette thèse, le résidu 447 a été identifié comme étant impliqué dans l'infection et dans l'échappement du HCV aux nAbs (Fofana et al., 2012). Par mutagenèse dirigée, nous avons généré deux mutants chez lesquels la phénylalanine en position 447 a été remplacée par

une leucine ou par une alanine. Afin de déterminer si ces mutants utilisent apoE de manière différente du VL parental, nous avons testé l'effet de l'anticorps dirigé contre l'apoE 1D7 sur l'infectiosité de ces virus. Alors que le VL est hautement inhibé par cet anticorps, les mutants VL F447L et F447A y sont 3 fois moins sensibles (Figure 22A). Ces données indiquent que l'utilisation d'apoE est plus importante chez le VL que chez les mutants 447. Enfin, nous avons regardé si ces différences de sensibilité des mutants aux anticorps anti-apoE étaient dues à une association altérée des particules virales avec apoE. Pour cela nous avons immunoprécipité les différents variants avec une IgG non spécifique, un anti-E2 (AP33) ou différents anticorps anti-apoE (1D7, 3H1 et 6C5). Comme décrit précédemment l'anticorps 1D7 reconnaît le domaine de liaison d'apoE au LDL-R. L'anticorps 6C5 reconnaît les 15 premiers acides aminés d'apoE alors que l'anticorps 3H1 reconnaît la région 243-272 d'apoE. Nous avons observé que les trois anticorps anti-apoE étaient 2,5 fois plus efficaces à immunoprécipiter le VL que les mutants 447 (Figure 22B), indiquant une association plus robuste du variant d'échappement VL à apoE.

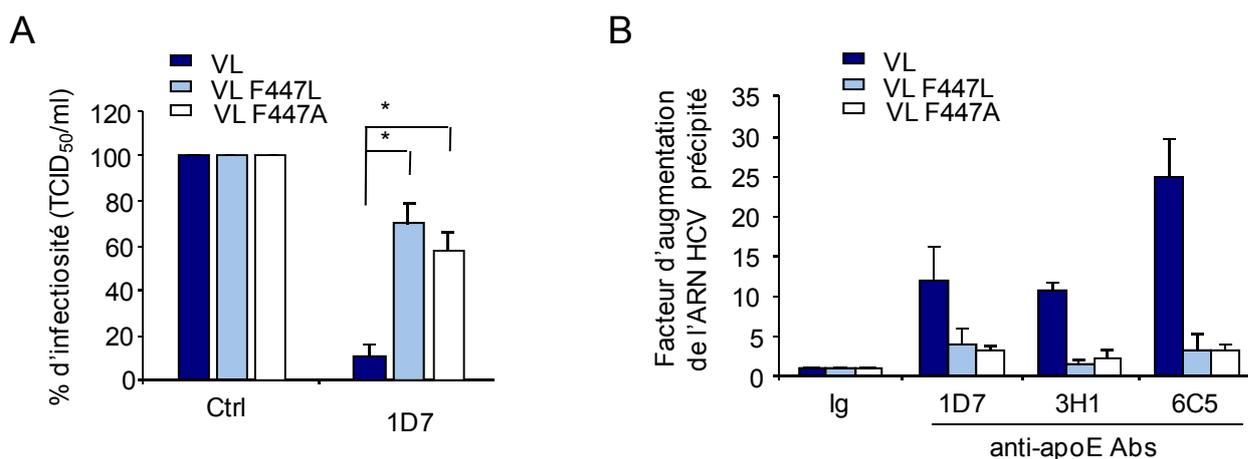


Figure 22. Le résidu 447 de la glycoprotéine E2 module les interactions entre l'apoE et le HCV. (A) Les HCVcc ont été incubés avec l'anticorps 1D7 ciblant le LDL-R d'apoE ou avec une IgG contrôle (Ctrl) avant d'infecter des cellules Huh7.5.1. L'infectiosité a été testée par TCID₅₀. Les résultats sont exprimés en tant que pourcentage d'infectiosité relative au contrôle. Les moyennes et les SEM de trois expériences réalisées sont représentés. * $p < 0,05$ **(B)** Les HCVcc du VL et des mutants VL F447L et VL F447A ont été immunoprécipités avec une IgG contrôle (Ctrl), l'anticorps anti-E2 (AP33) ou trois différents anticorps anti-apoE (1D7, 3H1, 6C5). L'ARN du HCV a été extrait à partir des précipités et quantifié par qRT-PCR. Les résultats sont exprimés en tant que facteur d'augmentation relatif à l'ARN immunoprécipité avec l'IgG contrôle (=1). La moyenne et les SEM de 2 expériences sont représentés.

II. Discussion

Le HCV s'associe aux TRLs dans le sérum des patients et nécessite des éléments des VLDL pour l'assemblage et la production de particules virales infectieuses (incluant apoE) (Andre et al., 2002 ; Benga et al., 2010 ; Merz et al., 2011). Des études antérieures ont suggéré un rôle de HVR1 et du résidu 451 de E2 dans l'interaction HCV-TRL (Bankwitz et al., 2010 ; Grove et al., 2008). Cependant l'absence de virus TRL-associé en culture cellulaire a limité l'étude du rôle de ces interactions hôte-virus dans l'échappement viral au système immunitaire (Andre et al., 2002 ; Grove et al., 2008 ; Prentoe et al., 2011). Dans notre étude et en utilisant le variant VL pour ses propriétés d'échappement aux nAbs, nous avons démontré le rôle essentiel des lipoprotéines et plus particulièrement de l'apoE dans l'échappement aux nAbs. Il a été suggéré que l'absence de virus associés avec les TRLs dans les études décrites jusqu'à maintenant était due à un métabolisme lipidique altéré dans les cellules Huh7.5.1. Cependant l'obtention de cellules produisant de grandes quantités de VLDL n'induit pas une répartition supérieure des LVP dans les fractions de plus faible densité suggérant que d'autres éléments contribuent probablement à cette distribution virale (Jammart et al., 2013). Nos résultats semblent ainsi indiquer que l'association avec les TRL est en partie dépendante des virus utilisés et notamment de leur GP d'enveloppe.

Nous avons observé que les virus présents dans les fractions de densité autour de 1.03 g/ml étaient les plus capables d'échapper à la neutralisation. La raison pour laquelle les virus présents à des densités inférieures ou supérieures à 1.03 g/ml sont neutralisés nécessite d'être éclaircie. La caractérisation complète des éléments lipoprotéiques tels que les différentes apolipoprotéines, et les TG présents dans les différentes fractions est actuellement en cours. Ces données pourront nous informer pourquoi malgré la présence d'apoE dans la fraction de très faible densité (F1) et les fractions de plus hautes densités (F4, F5), seuls les virus présents en fraction 2 (F2) échappent à près de 100% à la neutralisation par les nAbs.

Nous avons également mis en évidence que l'apoE joue un rôle majeur dans l'infection des cellules par du virus libre mais qu'elle ne semble pas impliquée dans la transmission du HCV de cellule à cellule. Nous ne pouvons cependant pas exclure que d'autres épitopes d'apoE non ciblés par l'anticorps utilisé dans ces expériences (1D7) soient impliqués dans la transmission du virus de cellule à cellule.

Notre étude a permis de définir qu'apoE contribue à l'échappement viral et à la persistance du HCV. Plus de 90% de l'apoE circulant dans l'organisme est dérivé du foie, il est ainsi probable que le HCV se soit adapté à ce facteur de l'hôte afin de dissimuler ses épitopes et limiter sa reconnaissance par le système immunitaire. Récemment, il a été décrit que le HAV utilise les composants membranaires des cellules afin de générer des formes virales enveloppées et

d'échapper aux nAbs (Feng et al., 2013). De même, notre étude indique que le HCV a développé un mécanisme afin d'exploiter les composants de l'hôte et d'établir une infection persistante.

La découverte que les interactions entre le HCV et apoE jouent un rôle majeur dans l'échappement aux nAbs a des implications majeures à la fois pour la compréhension de la pathogenèse virale ainsi que pour le développement d'immunothérapies et de vaccins. En effet, de nombreux vaccins reposent sur la production de nAbs (Nabel, 2013). Nos données suggèrent donc que la génération de nouveaux candidats vaccins devrait intégrer à la fois des composants viraux et des lipoprotéines pour optimiser la production de nAbs capables de détecter la LVP et d'empêcher la persistance du HCV.

Conclusion générale et perspectives

La cirrhose au stade terminal et le HCC associés au HCV sont des indications majeures de TH. Cependant en l'absence de stratégie de prévention, la réinfection du greffon est systématique. Bien que le traitement de l'hépatite chronique C ait connu une avancée majeure avec le développement des DAA, l'utilisation de ces nouvelles molécules pour les patients transplantés reste limitée. Le développement d'un moyen de prévention de la réinfection du greffon et d'un vaccin prophylactique reste donc une nécessité afin de diminuer la morbidité et la mortalité liées à ce virus. La principale limite au développement d'un vaccin efficace est la variabilité génétique du HCV qui lui permet à travers des mécanismes multiples de s'adapter à son environnement, d'échapper à la réponse immunitaire et d'entrer efficacement dans la cellule hôte malgré la présence des nAbs (Fafi-Kremer et al., 2012 ; Fafi-Kremer et al., 2010 ; von Hahn et al., 2007). La compréhension des mécanismes d'échappement du HCV à la réponse immunitaire pendant les étapes précoces de l'infection est indispensable au développement d'un vaccin efficace contre le HCV.

Dans ce travail de thèse, nous avons identifié deux nouveaux mécanismes d'échappement viral. L'analyse fonctionnelle approfondie d'un variant sélectionné après TH, a permis d'identifier des mutations au niveau de l'enveloppe virale (GP E2), qui permettent au virus non seulement d'échapper aux nAbs mais également d'utiliser différemment les récepteurs cellulaires tel que le CD81. Cette évolution doublement favorable permet au HCV d'optimiser les premières étapes de l'infection et de favoriser sa persistance. Des analyses fonctionnelles utilisant un panel d'anticorps dérivés d'une centaine de patients chroniquement infectés par le HCV suggèrent que ce mécanisme serait également impliqué dans la persistance du HCV au cours de l'hépatite C chronique en général. L'ensemble de ces données apporte des éléments nouveaux dans la compréhension des mécanismes moléculaires de la résistance du HCV au système immunitaire au cours de la TH et de l'hépatite C chronique en général.

Dans la seconde partie de ce travail de thèse, nous avons démontré que le HCV en plus de moduler son interaction avec le récepteur cellulaire CD81 via sa GP d'enveloppe, bénéficie de son association avec les lipoprotéines et les apolipoprotéines afin d'échapper aux nAbs. L'étude du profil de densité du variant VL (variant hautement résistant à la neutralisation) a montré une distribution importante du virus dans les fractions de faible densité. L'incubation de chaque fraction avec des sérums de patients chroniquement infectés par le HCV a démontré que les virus les plus résistants à la neutralisation par les nAbs sont présents dans les fractions aux alentours de 1.03 g/ml. Nous avons également mis en évidence que l'apoE qui joue un rôle dans l'infection et la production de particules virales, semble également être un facteur déterminant dans l'échappement du virus aux nAbs. La diminution de l'expression d'apoE augmente de plus

Conclusion générale et perspectives

de dix fois la sensibilité du HCV aux nAbs. Les interactions du HCV avec les lipoprotéines et plus particulièrement apoE, permettraient au virus de masquer certains de ses épitopes et échapper aux réponses immunitaires de l'hôte. Enfin nous avons identifié que le résidu 447 de la GP E2 joue un rôle dans les interactions entre le HCV et l'apoE.

Plusieurs expériences supplémentaires sont nécessaires afin d'approfondir notre analyse du rôle des lipoprotéines et des apolipoprotéines dans l'échappement du HCV aux nAbs. Nous avons observé que les particules infectieuses présentes aux densités de 1.03 g/ml étaient les plus aptes à échapper aux nAbs. Une étude approfondie des facteurs présents aux différentes densités est indispensable afin de déterminer si apoE nécessite également la présence d'autres molécules afin de protéger le HCV de la reconnaissance par les nAbs. Pour cela nous doserons les TRL et étudierons la présence et la quantité d'autres apolipoprotéines (ex. apoAI et apoB) dans les différentes fractions de densité. Nous utiliserons également des cellules dans lesquelles l'expression d'apoAI et d'apoB a été diminuée afin de déterminer si ces autres apolipoprotéines pourraient également participer à la dissimulation des épitopes du HCV aux nAbs ou si cette fonction est spécifique à apoE.

Il serait également intéressant de confirmer le rôle d'apoE dans l'échappement viral en utilisant un autre variant du HCV que le variant VL. Par exemple, le variant JFH1 (génotype 2a) serait intéressant à étudier étant donné qu'il présente un pourcentage plus important de virus dans les fractions de faibles densité que le Jc1 (Gastaminza et al., 2006). L'étude additionnelle d'un variant du même génotype que le variant VL (génotype 1b) (ex. variant con1), pourrait également être intéressante. En effet, ces informations pourraient préciser si le génotype viral joue un rôle dans l'utilisation des lipoprotéines et des apolipoprotéines par le HCV afin d'échapper aux nAbs.

Si ces expériences confirment l'importance de l'interaction du HCV avec apoE pour l'échappement viral, nos données pourraient être utilisées afin de développer de nouveaux candidats vaccins. Il semble en effet important de tenir compte du rôle joué par les lipoprotéines et les apolipoprotéines dans l'échappement viral, afin d'utiliser le matériel adéquat lors du développement de nouveaux anticorps ou vaccins prophylactiques. Plusieurs candidats vaccins sont basés sur l'utilisation de sous-unités du HCV seules ou intégrées dans un modèle viral. La conformation des GPs du HCV y est probablement différente par rapport à celle des GP au sein de la LVP, empêchant le développement de nAbs efficaces *in vivo*.

Références

A

- Agnello, V., Abel, G., Elfahal, M., Knight, G.B., and Zhang, Q.X. (1999). Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 12766-12771.
- Aizaki, H., Lee, K.J., Sung, V.M., Ishiko, H., and Lai, M.M. (2004). Characterization of the hepatitis C virus RNA replication complex associated with lipid rafts. *Virology* 324, 450-461.
- Aizaki, H., Morikawa, K., Fukasawa, M., Hara, H., Inoue, Y., Tani, H., Saito, K., Nishijima, M., Hanada, K., Matsuura, Y., Lai, M.M., Miyamura, T., Wakita, T., and Suzuki, T. (2008). Critical role of virion-associated cholesterol and sphingolipid in hepatitis C virus infection. *J Virol* 82, 5715-5724.
- Albecka, A., Belouzard, S., Op de Beeck, A., Descamps, V., Goueslain, L., Bertrand-Michel, J., Terce, F., Duverlie, G., Rouille, Y., and Dubuisson, J. (2012). Role of low-density lipoprotein receptor in the hepatitis C virus life cycle. *Hepatology* 55, 998-1007.
- Albecka, A., Montserret, R., Krey, T., Tarr, A.W., Diesis, E., Ball, J.K., Descamps, V., Duverlie, G., Rey, F., Penin, F., and Dubuisson, J. (2011). Identification of new functional regions in hepatitis C virus envelope glycoprotein E2. *J Virol* 85, 1777-1792.
- Ali, S.H., and DeCaprio, J.A. (2001). Cellular transformation by SV40 large T antigen: interaction with host proteins. *Semin Cancer Biol* 11, 15-23.
- Amako, Y., Tsukiyama-Kohara, K., Katsume, A., Hirata, Y., Sekiguchi, S., Tobita, Y., Hayashi, Y., Hishima, T., Funata, N., Yonekawa, H., and Kohara, M. (2010). Pathogenesis of hepatitis C virus infection in *Tupaia belangeri*. *J Virol* 84, 303-311.
- Andre, P., Komurian-Pradel, F., Deforges, S., Perret, M., Berland, J.L., Sodoyer, M., Pol, S., Brechot, C., Paranhos-Baccala, G., and Lotteau, V. (2002). Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles. *J Virol* 76, 6919-6928.
- Anjum, S., Wahid, A., Afzal, M.S., Albecka, A., Alsaleh, K., Ahmad, T., Baumert, T.F., Wychowski, C., Penin, F., and Dubuisson, J. (2013). Additional Glycosylation within a Specific Hypervariable Region of Subtype 3a of Hepatitis C Virus Protects Against Virus Neutralization. *J Infect Dis*.

Appel, N., Zayas, M., Miller, S., Krijnse-Locker, J., Schaller, T., Friebe, P., Kallis, S., Engel, U., and Bartenschlager, R. (2008). Essential role of domain III of nonstructural protein 5A for hepatitis C virus infectious particle assembly. *PLoS Pathog* 4, e1000035.

Asselah, T., and Marcellin, P. (2011). New direct-acting antivirals' combination for the treatment of chronic hepatitis C. *Liver Int* 31 *Suppl* 1, 68-77.

Asselah, T., and Marcellin, P. (2013). Interferon free therapy with direct acting antivirals for HCV. *Liver Int* 33 *Suppl* 1, 93-104.

B

Bankwitz, D., Steinmann, E., Bitzegeio, J., Ciesek, S., Friesland, M., Herrmann, E., Zeisel, M.B., Baumert, T.F., Keck, Z.Y., Fong, S.K., Pecheur, E.I., and Pietschmann, T. (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.

Bartenschlager, R. (Ed), (2013). *Hepatitis C Virus: From Molecular Virology to Antiviral Therapy*. Current Topics in Microbiology and Immunology 369.

Barnes, E., Folgori, A., Capone, S., Swadling, L., Aston, S., Kurioka, A., Meyer, J., Huddart, R., Smith, K., Townsend, R., Brown, A., Antrobus, R., Ammendola, V., Naddeo, M., O'Hara, G., Willberg, C., Harrison, A., Grazioli, F., Esposito, M.L., Siani, L., Traboni, C., Oo, Y., Adams, D., Hill, A., Colloca, S., Nicosia, A., Cortese, R., and Klenerman, P. (2012). Novel adenovirus-based vaccines induce broad and sustained T cell responses to HCV in man. *Sci Transl Med* 4, 115ra111.

Bartenschlager, R. (2006). Hepatitis C virus molecular clones: from cDNA to infectious virus particles in cell culture. *Curr Opin Microbiol* 9, 416-422.

Bartenschlager, R., Cosset, F.L., and Lohmann, V. (2010). Hepatitis C virus replication cycle. *J Hepatol* 53, 583-585.

Bartenschlager, R., Penin, F., Lohmann, V., and Andre, P. (2011). Assembly of infectious hepatitis C virus particles. *Trends Microbiol* 19, 95-103.

Barth, H., Cerino, R., Arcuri, M., Hoffmann, M., Schurmann, P., Adah, M.I., Gissler, B., Zhao, X., Ghisetti, V., Lavezzo, B., Blum, H.E., von Weizsacker, F., Vitelli, A., Scarselli, E., and Baumert, T.F. (2005). Scavenger receptor class B type I and hepatitis C virus infection of primary tupaia hepatocytes. *J Virol* 79, 5774-5785.

Barth, H., Liang, T.J., and Baumert, T.F. (2006a). Hepatitis C virus entry: molecular biology and clinical implications. *Hepatology* 44, 527-535.

- Barth, H., Rybczynska, J., Patient, R., Choi, Y., Sapp, R.K., Baumert, T.F., Krawczynski, K., and Liang, T.J. (2011). Both innate and adaptive immunity mediate protective immunity against hepatitis C virus infection in chimpanzees. *Hepatology* 54, 1135-1148.
- Barth, H., Schafer, C., Adah, M.I., Zhang, F., Linhardt, R.J., Toyoda, H., Kinoshita-Toyoda, A., Toida, T., Van Kuppevelt, T.H., Depla, E., Von Weizsacker, F., Blum, H.E., and Baumert, T.F. (2003). Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate. *J Biol Chem* 278, 41003-41012.
- Barth, H., Schnober, E.K., Zhang, F., Linhardt, R.J., Depla, E., Boson, B., Cosset, F.L., Patel, A.H., Blum, H.E., and Baumert, T.F. (2006b). Viral and cellular determinants of the hepatitis C virus envelope-heparan sulfate interaction. *J Virol* 80, 10579-10590.
- Bartosch, B., Dubuisson, J., and Cosset, F.L. (2003a). Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J Exp Med* 197, 633-642.
- Bartosch, B., Verney, G., Dreux, M., Donot, P., Morice, Y., Penin, F., Pawlotsky, J.M., Lavillette, D., and Cosset, F.L. (2005). An interplay between hypervariable region 1 of the hepatitis C virus E2 glycoprotein, the scavenger receptor BI, and high-density lipoprotein promotes both enhancement of infection and protection against neutralizing antibodies. *J Virol* 79, 8217-8229.
- Bartosch, B., Vitelli, A., Granier, C., Goujon, C., Dubuisson, J., Pascale, S., Scarselli, E., Cortese, R., Nicosia, A., and Cosset, F.L. (2003b). 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.
- Bassendine, M.F., Sheridan, D.A., Felmlee, D.J., Bridge, S.H., Toms, G.L., and Neely, R.D. (2011). HCV and the hepatic lipid pathway as a potential treatment target. *J Hepatol* 55, 1428-1440.
- Baumert, T.F., Ito, S., Wong, D.T., and Liang, T.J. (1998). Hepatitis C virus structural proteins assemble into viruslike particles in insect cells. *J Virol* 72, 3827-3836.
- Beaumont, E., Patient, R., Hourieux, C., Dimier-Poisson, I., and Roingard, P. (2012). Chimeric HBV-HCV envelope proteins elicit broadly neutralizing antibodies and constitute a potential bivalent prophylactic vaccine. *Hepatology*. 57, 1303-13
- Benedicto, I., Molina-Jimenez, F., Barreiro, O., Maldonado-Rodriguez, A., Prieto, J., Moreno-Otero, R., Aldabe, R., Lopez-Cabrera, M., and Majano, P.L. (2008). Hepatitis C virus envelope components alter localization of hepatocyte tight junction-associated proteins and promote occludin retention in the endoplasmic reticulum. *Hepatology* 48, 1044-1053.

- Benedicto, I., Molina-Jimenez, F., Bartosch, B., Cosset, F.L., Lavillette, D., Prieto, J., Moreno-Otero, R., Valenzuela-Fernandez, A., Aldabe, R., Lopez-Cabrera, M., and Majano, P.L. (2009). The tight junction-associated protein occludin is required for a postbinding step in hepatitis C virus entry and infection. *J Virol* **83**, 8012-8020.
- Benga, W.J., Krieger, S.E., Dimitrova, M., Zeisel, M.B., Parnot, M., Lupberger, J., Hildt, E., Luo, G., McLauchlan, J., Baumert, T.F., and Schuster, C. (2010). Apolipoprotein E interacts with hepatitis C virus nonstructural protein 5A and determines assembly of infectious particles. *Hepatology* **51**, 43-53.
- 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.
- Bettters, J.L., and Yu, L. (2010). NPC1L1 and cholesterol transport. *FEBS Lett* **584**, 2740-2747.
- Bility, M.T., Zhang, L., Washburn, M.L., Curtis, T.A., Kovalev, G.I., and Su, L. (2012). Generation of a humanized mouse model with both human immune system and liver cells to model hepatitis C virus infection and liver immunopathogenesis. *Nat Protoc* **7**, 1608-1617.
- Bissig, K.D., Le, T.T., Woods, N.B., and Verma, I.M. (2007). Repopulation of adult and neonatal mice with human hepatocytes: a chimeric animal model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 20507-20511.
- Bissig, K.D., Wieland, S.F., Tran, P., Isogawa, M., Le, T.T., Chisari, F.V., and Verma, I.M. (2010). Human liver chimeric mice provide a model for hepatitis B and C virus infection and treatment. *J Clin Invest* **120**, 924-930.
- Blaising, J., Levy, P.L., Gondeau, C., Phelip, C., Varbanov, M., Teissier, E., Ruggiero, F., Polyak, S.J., Oberlies, N.H., Ivanovic, T., Boulant, S., and Pecheur, E.I. (2013a). Silibinin inhibits hepatitis C virus entry into hepatocytes by hindering clathrin-dependent trafficking. *Cell Microbiol.* **15**, 1866-82
- Blaising, J., Levy, P.L., Polyak, S.J., Stanifer, M., Boulant, S., and Pecheur, E.I. (2013b). Arbidol inhibits viral entry by interfering with clathrin-dependent trafficking. *Antiviral Res* **100**, 215-219.
- Blanchard, E., Belouzard, S., Goueslain, L., Wakita, T., Dubuisson, J., Wychowski, C., and Rouille, Y. (2006). Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J Virol* **80**, 6964-6972.
- Blight, K.J., McKeating, J.A., Marcotrigiano, J., and Rice, C.M. (2003). Efficient replication of hepatitis C virus genotype 1a RNAs in cell culture. *J Virol* **77**, 3181-3190.

Références

Boson, B., Granio, O., Bartenschlager, R., and Cosset, F.L. (2011). A concerted action of hepatitis C virus p7 and nonstructural protein 2 regulates core localization at the endoplasmic reticulum and virus assembly. *PLoS Pathog* 7, e1002144.

Boulant, S., Vanbelle, C., Ebel, C., Penin, F., and Lavergne, J.P. (2005). Hepatitis C virus core protein is a dimeric alpha-helical protein exhibiting membrane protein features. *J Virol* 79, 11353-11365.

Brimacombe, C.L., Grove, J., Meredith, L.W., Hu, K., Syder, A.J., Flores, M.V., Timpe, J.M., Krieger, S.E., Baumert, T.F., Tellinghuisen, T.L., Wong-Staal, F., Balfe, P., and McKeating, J.A. (2011). Neutralizing antibody-resistant hepatitis C virus cell-to-cell transmission. *J Virol* 85, 596-605.

Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1986). A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232, 34-47.

Buhler, S., and Bartenschlager, R. (2012). Promotion of hepatocellular carcinoma by hepatitis C virus. *Dig Dis* 30, 445-452.

Bukh, J. (2004). A critical role for the chimpanzee model in the study of hepatitis C. *Hepatology* 39, 1469-1475.

Bukh, J. (2012). Animal models for the study of hepatitis C virus infection and related liver disease. *Gastroenterology* 142, 1279-1287 e1273.

C

Carrion, J.A., Martinez-Bauer, E., Crespo, G., Ramirez, S., Perez-del-Pulgar, S., Garcia-Valdecasas, J.C., Navasa, M., and Forns, X. (2009). Antiviral therapy increases the risk of bacterial infections in HCV-infected cirrhotic patients awaiting liver transplantation: A retrospective study. *J Hepatol* 50, 719-728.

Catanese, M.T., Ansuini, H., Graziani, R., Huby, T., Moreau, M., Ball, J.K., Paonessa, G., Rice, C.M., Cortese, R., Vitelli, A., and Nicosia, A. (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., Loureiro, J., Jones, C.T., Dorner, M., von Hahn, T., and Rice, C.M. (2013a). Different Requirements for Scavenger Receptor Class B Type I in Hepatitis C Virus Cell-Free versus Cell-to-Cell Transmission. *J Virol* 87, 8282-8293.

Catanese, M.T., Uryu, K., Kopp, M., Edwards, T.J., Andrus, L., Rice, W.J., Silvestry, M., Kuhn, R.J., and Rice, C.M. (2013b). Ultrastructural analysis of hepatitis C virus particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 9505-9510.

- Chamoun-Emanuelli, A.M., Pecheur, E.I., Simeon, R.L., Huang, D., Cremer, P.S., and Chen, Z. (2013). Phenothiazines inhibit hepatitis C virus entry, likely by increasing the fluidity of cholesterol-rich membranes. *Antimicrob Agents Chemother* 57, 2571-2581.
- Chandler, D.E., Penin, F., Schulten, K., and Chipot, C. (2012). The p7 protein of hepatitis C virus forms structurally plastic, minimalist ion channels. *PLoS Comput Biol* 8, e1002702.
- Chang, K.S., Jiang, J., Cai, Z., and Luo, G. (2007). Human apolipoprotein e is required for infectivity and production of hepatitis C virus in cell culture. *J Virol* 81, 13783-13793.
- Charlton, M., Seaberg, E., Wiesner, R., Everhart, J., Zetterman, R., Lake, J., Detre, K., and Hoofnagle, J. (1998). Predictors of patient and graft survival following liver transplantation for hepatitis C. *Hepatology* 28, 823-830.
- Chatel-Chaix, L., Germain, M.A., Gotte, M., and Lamarre, D. (2012). Direct-acting and host-targeting HCV inhibitors: current and future directions. *Curr Opin Virol* 2, 588-598.
- Cheent, K., and Khakoo, S.I. (2011). Natural killer cells and hepatitis C: action and reaction. *Gut* 60, 268-278.
- Chisari, F.V. (2005). Unscrambling hepatitis C virus-host interactions. *Nature* 436, 930-932.
- Choo, Q.L., Kuo, G., Ralston, R., Weiner, A., Chien, D., Van Nest, G., Han, J., Berger, K., Thudium, K., Kuo, C., and et al. (1994). Vaccination of chimpanzees against infection by the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 1294-1298.
- Choo, Q.L., Kuo, G., Weiner, A.J., Overby, L.R., Bradley, D.W., and Houghton, M. (1989). Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244, 359-362.
- Chua, B.Y., Johnson, D., Tan, A., Earnest-Silveira, L., Sekiya, T., Chin, R., Torresi, J., and Jackson, D.C. (2012). Hepatitis C VLPs delivered to dendritic cells by a TLR2 targeting lipopeptide results in enhanced antibody and cell-mediated responses. *PLoS One* 7, e47492.
- Chung, R.T., Gordon, F.D., Curry, M.P., Schiano, T.D., Emre, S., Corey, K., Markmann, J.F., Hertl, M., Pomposelli, J.J., Pomfret, E.A., Florman, S., Schilsky, M., Broering, T.J., Finberg, R.W., Szabo, G., Zamore, P.D., Khettry, U., Babcock, G.J., Ambrosino, D.M., Leav, B., Leney, M., Smith, H.L., and Molrine, D.C. (2013). Human monoclonal antibody MBL-HCV1 delays HCV viral rebound following liver transplantation: a randomized controlled study. *Am J Transplant* 13, 1047-1054.

Références

- Ciesek, S., Steinmann, E., Iken, M., Ott, M., Helfritz, F.A., Wappler, I., Manns, M.P., Wedemeyer, H., and Pietschmann, T. (2010). Glucocorticosteroids increase cell entry by hepatitis C virus. *Gastroenterology* *138*, 1875-1884.
- Ciesek, S., Steinmann, E., Wedemeyer, H., Manns, M.P., Neyts, J., Tautz, N., Madan, V., Bartenschlager, R., von Hahn, T., and Pietschmann, T. (2009). Cyclosporine A inhibits hepatitis C virus nonstructural protein 2 through cyclophilin A. *Hepatology* *50*, 1638-1645.
- Cocquerel, L., Op de Beeck, A., Lambot, M., Roussel, J., Delgrange, D., Pillez, A., Wychowski, C., Penin, F., and Dubuisson, J. (2002). Topological changes in the transmembrane domains of hepatitis C virus envelope glycoproteins. *EMBO J* *21*, 2893-2902.
- Codran, A., Royer, C., Jaeck, D., Bastien-Valle, M., Baumert, T.F., Kieny, M.P., Pereira, C.A., and Martin, J.P. (2006). Entry of hepatitis C virus pseudotypes into primary human hepatocytes by clathrin-dependent endocytosis. *J Gen Virol* *87*, 2583-2593.
- Coilly, A., Furlan, V., Roche, B., Barau, C., Noel, C., Bonhomme-Faivre, L., Antonini, T.M., Roque-Afonso, A.M., Samuel, D., Taburet, A.M., and Duclos-Vallee, J.C. (2012). Practical management of boceprevir and immunosuppressive therapy in liver transplant recipients with hepatitis C virus recurrence. *Antimicrob Agents Chemother* *56*, 5728-5734.
- Colloca, S., Barnes, E., Folgori, A., Ammendola, V., Capone, S., Cirillo, A., Siani, L., Naddeo, M., Grazioli, F., Esposito, M.L., Ambrosio, M., Sparacino, A., Bartiromo, M., Meola, A., Smith, K., Kurioka, A., O'Hara, G.A., Ewer, K.J., Anagnostou, N., Bliss, C., Hill, A.V., Traboni, C., Klenerman, P., Cortese, R., and Nicosia, A. (2012). Vaccine vectors derived from a large collection of simian adenoviruses induce potent cellular immunity across multiple species. *Sci Transl Med* *4*, 115ra112.
- Cooper, S., Erickson, A.L., Adams, E.J., Kansopon, J., Weiner, A.J., Chien, D.Y., Houghton, M., Parham, P., and Walker, C.M. (1999). Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus. *Immunity* *10*, 439-449.
- Cormier, E.G., Durso, R.J., Tsamis, F., Boussemart, L., Manix, C., Olson, W.C., Gardner, J.P., and Dragic, T. (2004). L-SIGN (CD209L) and DC-SIGN (CD209) mediate transinfection of liver cells by hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 14067-14072.
- Cornberg, M., Razavi, H.A., Alberti, A., Bernasconi, E., Buti, M., Cooper, C., Dalgard, O., Dillion, J.F., Flisiak, R., Forns, X., Frankova, S., Goldis, A., Goulis, I., Halota, W., Hunyady, B., Lagging, M., Largen, A., Makara, M., Manolakopoulos, S., Marcellin, P., Marinho, R.T., Pol, S., Poynard, T., Puoti, M., Sagalova, O., Sibbel, S., Simon, K., Wallace, C., Young, K., Yurdaydin, C., Zuckerman, E., Negro, F., and Zeuzem, S.

Références

(2011). A systematic review of hepatitis C virus epidemiology in Europe, Canada and Israel. *Liver Int* 31 *Suppl 2*, 30-60.

Crespo, G., Marino, Z., Navasa, M., and Forns, X. (2012). Viral hepatitis in liver transplantation. *Gastroenterology* 142, 1373-1383 e1371.

Cun, W., Jiang, J., and Luo, G. (2010). The C-terminal alpha-helix domain of apolipoprotein E is required for interaction with nonstructural protein 5A and assembly of hepatitis C virus. *J Virol* 84, 11532-11541.

D

Da Costa, D., Turek, M., Felmler, D.J., Girardi, E., Pfeffer, S., Long, G., Bartenschlager, R., Zeisel, M.B., and Baumert, T.F. (2012). Reconstitution of the entire hepatitis C virus life cycle in nonhepatic cells. *J Virol* 86, 11919-11925.

Dao Thi, V.L., Granier, C., Zeisel, M.B., Guerin, M., Mancip, J., Granio, O., Penin, F., Lavillette, D., Bartenschlager, R., Baumert, T.F., Cosset, F.L., and Dreux, M. (2012). Characterization of hepatitis C virus particle subpopulations reveals multiple usage of the scavenger receptor BI for entry steps. *J Biol Chem* 287, 31242-31257.

Date, T., Morikawa, K., Tanaka, Y., Tanaka-Kaneko, K., Sata, T., Mizokami, M., and Wakita, T. (2012). Replication and infectivity of a novel genotype 1b hepatitis C virus clone. *Microbiol Immunol* 56, 308-317.

Davis, G.L., Alter, M.J., El-Serag, H., Poynard, T., and Jennings, L.W. (2010). Aging of hepatitis C virus (HCV)-infected persons in the United States: a multiple cohort model of HCV prevalence and disease progression. *Gastroenterology* 138, 513-521, 521 e511-516.

de Jong, Y.P., Rice, C.M., and Ploss, A. (2010). New horizons for studying human hepatotropic infections. *J Clin Invest* 120, 650-653.

Deng, Y., Foley, E.M., Gonzales, J.C., Gordts, P.L., Li, Y., and Esko, J.D. (2012). Shedding of syndecan-1 from human hepatocytes alters very low density lipoprotein clearance. *Hepatology* 55, 277-286.

Dentzer, T.G., Lorenz, I.C., Evans, M.J., and Rice, C.M. (2009). Determinants of the hepatitis C virus nonstructural protein 2 protease domain required for production of infectious virus. *J Virol* 83, 12702-12713.

Diao, J., Pantua, H., Ngu, H., Komuves, L., Diehl, L., Schaefer, G., and Kapadia, S.B. (2012). Hepatitis C virus induces epidermal growth factor receptor activation via CD81 binding for viral internalization and entry. *J Virol* 86, 10935-10949.

Références

- Donahue, J.G., Munoz, A., Ness, P.M., Brown, D.E., Jr., Yawn, D.H., McAllister, H.A., Jr., Reitz, B.A., and Nelson, K.E. (1992). The declining risk of post-transfusion hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 327, 369-373.
- Dorner, M., Horwitz, J.A., Donovan, B.M., Labitt, R.N., Budell, W.C., Friling, T., Vogt, A., Catanese, M.T., Satoh, T., Kawai, T., Akira, S., Law, M., Rice, C.M., and Ploss, A. (2013). Completion of the entire hepatitis C virus life cycle in genetically humanized mice. *Nature*. 501, 237-41
- Dorner, M., Horwitz, J.A., Robbins, J.B., Barry, W.T., Feng, Q., Mu, K., Jones, C.T., Schoggins, J.W., Catanese, M.T., Burton, D.R., Law, M., Rice, C.M., and Ploss, A. (2011). A genetically humanized mouse model for hepatitis C virus infection. *Nature* 474, 208-211.
- Dorner, M., Rice, C.M., and Ploss, A. (2012). Study of hepatitis C virus entry in genetically humanized mice. *Methods*. 59, 249-57
- Douam, F., Thi, V.L., Maurin, G., Fresquet, J., Mompelat, D., Zeisel, M.B., Baumert, T.F., Cosset, F.L., and Lavillette, D. (2013). A critical interaction between E1 and E2 glycoproteins determines binding and fusion properties of hepatitis C virus during cell entry. *Hepatology*. [Epub ahead of print]
- Drane, D., Maraskovsky, E., Gibson, R., Mitchell, S., Barnden, M., Moskwa, A., Shaw, D., Gervase, B., Coates, S., Houghton, M., and Basser, R. (2009). Priming of CD4+ and CD8+ T cell responses using a HCV core ISCOMATRIX vaccine: a phase I study in healthy volunteers. *Hum Vaccin* 5, 151-157.
- Dreux, M., Dao Thi, V.L., Fresquet, J., Guerin, M., Julia, Z., Verney, G., Durantel, D., Zoulim, F., Lavillette, D., Cosset, F.L., and Bartosch, B. (2009). Receptor complementation and mutagenesis reveal SR-BI as an essential HCV entry factor and functionally imply its intra- and extra-cellular domains. *PLoS Pathog* 5, e1000310.
- Dreux, M., Pietschmann, T., Granier, C., Voisset, C., Ricard-Blum, S., Mangeot, P.E., Keck, Z., Fong, S., Vu-Dac, N., Dubuisson, J., Bartenschlager, R., Lavillette, D., and Cosset, F.L. (2006). High density lipoprotein inhibits hepatitis C virus-neutralizing antibodies by stimulating cell entry via activation of the scavenger receptor BI. *J Biol Chem* 281, 18285-18295.
- Drummer, 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.
- Drummer, H.E., Boo, I., and Pountourios, P. (2007). Mutagenesis of a conserved fusion peptide-like motif and membrane-proximal heptad-repeat region of hepatitis C virus glycoprotein E1. *J Gen Virol* 88, 1144-1148.

Dubuisson, J., Helle, F., and Cocquerel, L. (2008). Early steps of the hepatitis C virus life cycle. *Cell Microbiol* 10, 821-827.

E

Elmowalid, G.A., Qiao, M., Jeong, S.H., Borg, B.B., Baumert, T.F., Sapp, R.K., Hu, Z., Murthy, K., and Liang, T.J. (2007). Immunization with hepatitis C virus-like particles results in control of hepatitis C virus infection in chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 8427-8432.

Evans, M.J., von Hahn, T., Tscherne, 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.

F

Fafi-Kremer, S., Fauvelle, C., Felmler, D.J., Zeisel, M.B., Lepiller, Q., Fofana, I., Heydmann, L., Stoll-Keller, F., and Baumert, T.F. (2012). Neutralizing antibodies and pathogenesis of hepatitis C virus infection. *Viruses* 4, 2016-2030.

Fafi-Kremer, S., Fofana, I., Soulier, E., Carolla, P., Meuleman, P., Leroux-Roels, G., Patel, A.H., Cosset, F.L., Pessaux, P., Doffoel, M., Wolf, P., Stoll-Keller, F., and Baumert, T.F. (2010). Viral entry and escape from antibody-mediated neutralization influence hepatitis C virus reinfection in liver transplantation. *J Exp Med* 207, 2019-2031.

Fafi-Kremer, S., Zeisel, M.B., Schvoerer, E., Soulier, E., Habersetzer, F., Wolf, P., Doffoel, M., Baumert, T.F., and Stoll-Keller, F. (2008). [Neutralizing antibodies in hepatitis C virus infection]. *Gastroenterol Clin Biol* 32, 491-498.

Falkowska, E., Kajumo, F., Garcia, E., Reinus, J., and Dragic, T. (2007). Hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 glycans modulate entry, CD81 binding, and neutralization. *J Virol* 81, 8072-8079.

Farci, P., Alter, H.J., Govindarajan, S., Wong, D.C., Engle, R., Lesniewski, R.R., Mushahwar, I.K., Desai, S.M., Miller, R.H., Ogata, N., and et al. (1992). Lack of protective immunity against reinfection with hepatitis C virus. *Science* 258, 135-140.

Farci, P., Alter, H.J., Wong, D.C., Miller, R.H., Govindarajan, S., Engle, R., Shapiro, M., and Purcell, R.H. (1994). Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees after antibody-mediated in vitro neutralization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 7792-7796.

Références

- Farci, P., Shimoda, A., Coiana, A., Diaz, G., Peddis, G., Melpolder, J.C., Strazzera, A., Chien, D.Y., Munoz, S.J., Balestrieri, A., Purcell, R.H., and Alter, H.J. (2000). The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. *Science* **288**, 339-344.
- Farquhar, M.J., Harris, H.J., and McKeating, J.A. (2011). Hepatitis C virus entry and the tetraspanin CD81. *Biochem Soc Trans* **39**, 532-536.
- Farquhar, M.J., Hu, K., Harris, H.J., Davis, C., Brimacombe, C.L., Fletcher, S.J., Baumert, T.F., Rappoport, J.Z., Balfe, P., and McKeating, J.A. (2012). Hepatitis C virus induces CD81 and claudin-1 endocytosis. *J Virol* **86**, 4305-4316.
- Fauvelle, C., Heydmann, L., Zeisel, M.B., Baumert, T.F., Stoll-Keller, F., and Fafi-Kremer, S. (2011). Virus de l'hépatite C et anticorps neutralisants. *Virologie* **15**, 326-336.
- Fauvelle, C., Lepiller, Q., Felmlee, D.J., Fofana, I., Habersetzer, F., Stoll-Keller, F., Baumert, T.F., and Fafi-Kremer, S. (2013). Hepatitis C virus vaccines - Progress and perspectives. *Microb Pathog* **58**, 66-72.
- Feinstone, S.M., Hu, D.J., and Major, M.E. (2012). Prospects for prophylactic and therapeutic vaccines against hepatitis C virus. *Clin Infect Dis* **55 Suppl 1**, S25-32.
- Feinstone, S.M., Kapikian, A.Z., Purcell, R.H., Alter, H.J., and Holland, P.V. (1975). Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N Engl J Med* **292**, 767-770.
- Feng, Z., Hensley, L., McKnight, K.L., Hu, F., Madden, V., Ping, L., Jeong, S.H., Walker, C., Lanford, R.E., and Lemon, S.M. (2013). A pathogenic picornavirus acquires an envelope by hijacking cellular membranes. *Nature* **496**, 367-371.
- Feray, C., Gigou, M., Samuel, D., Ducot, B., Maisonneuve, P., Reynes, M., Bismuth, A., and Bismuth, H. (1998). Incidence of hepatitis C in patients receiving different preparations of hepatitis B immunoglobulins after liver transplantation. *Ann Intern Med* **128**, 810-816.
- Fischer, G., Gallay, P., and Hopkins, S. (2010). Cyclophilin inhibitors for the treatment of HCV infection. *Curr Opin Investig Drugs* **11**, 911-918.
- Flint, M., Maidens, C., Loomis-Price, L.D., Shotton, C., Dubuisson, J., Monk, P., Higginbottom, A., Levy, S., and McKeating, J.A. (1999). Characterization of hepatitis C virus E2 glycoprotein interaction with a putative cellular receptor, CD81. *J Virol* **73**, 6235-6244.
- Flint, M., von Hahn, T., Zhang, J., Farquhar, M., Jones, C.T., Balfe, P., Rice, C.M., and McKeating, J.A. (2006). Diverse CD81 proteins support hepatitis C virus infection. *J Virol* **80**, 11331-11342.

- Flisiak, R., Feinman, S.V., Jablkowski, M., Horban, A., Kryczka, W., Pawlowska, M., Heathcote, J.E., Mazzella, G., Vandelli, C., Nicolas-Metral, V., Groscurin, P., Liz, J.S., Scalfaro, P., Porchet, H., and Crabbe, R. (2009). The cyclophilin inhibitor Debio 025 combined with PEG IFNalpha2a significantly reduces viral load in treatment-naive hepatitis C patients. *Hepatology* 49, 1460-1468.
- Flisiak, R., Horban, A., Gallay, P., Bobardt, M., Selvarajah, S., Wiercinska-Drapalo, A., Siwak, E., Cielniak, I., Higersberger, J., Kierkus, J., Aeschlimann, C., Groscurin, P., Nicolas-Metral, V., Dumont, J.M., Porchet, H., Crabbe, R., and Scalfaro, P. (2008). The cyclophilin inhibitor Debio-025 shows potent anti-hepatitis C effect in patients coinfecting with hepatitis C and human immunodeficiency virus. *Hepatology* 47, 817-826.
- Fofana, I., Fafi-Kremer, S., Carolla, P., Fauvelle, C., Zahid, M.N., Turek, M., Heydmann, L., Cury, K., Hayer, J., Combet, C., Cosset, F.L., Pietschmann, T., Hiet, M.S., Bartenschlager, R., Habersetzer, F., Doffoel, M., Keck, Z.Y., Fong, S.K., Zeisel, M.B., Stoll-Keller, F., and Baumert, T.F. (2012). Mutations that alter use of hepatitis C virus cell entry factors mediate escape from neutralizing antibodies. *Gastroenterology* 143, 223-233 e229.
- Fofana, I., Xiao, F., Thumann, C., Turek, M., Zona, L., Tawar, R.G., Grunert, F., Thompson, J., Zeisel, M.B., and Baumert, T.F. (2013a). A Novel Monoclonal Anti-CD81 Antibody Produced by Genetic Immunization Efficiently Inhibits Hepatitis C Virus Cell-Cell Transmission. *PLoS One* 8, e64221.
- Fofana, I., Zona, L., Thumann, C., Heydmann, L., Durand, S.C., Lupberger, J., Blum, H.E., Pessaux, P., Gondeau, C., Reynolds, G.M., McKeating, J.A., Grunert, F., Thompson, J., Zeisel, M.B., and Baumert, T.F. (2013b). Functional analysis of claudin-6 and claudin-9 as entry factors for hepatitis C virus infection of human hepatocytes by using monoclonal antibodies. *J Virol* 87, 10405-10410.
- Folgore, A., Capone, S., Ruggeri, L., Meola, A., Sporeno, E., Ercole, B.B., Pezzanera, M., Tafi, R., Arcuri, M., Fattori, E., Lahm, A., Luzzago, A., Vitelli, A., Colloca, S., Cortese, R., and Nicosia, A. (2006). A T-cell HCV vaccine eliciting effective immunity against heterologous virus challenge in chimpanzees. *Nat Med* 12, 190-197.
- Fournillier, A., Wychowski, C., Boucreux, D., Baumert, T.F., Meunier, J.C., Jacobs, D., Muguet, S., Depla, E., and Inchauspe, G. (2001). Induction of hepatitis C virus E1 envelope protein-specific immune response can be enhanced by mutation of N-glycosylation sites. *J Virol* 75, 12088-12097.
- Frey, S.E., Houghton, M., Coates, S., Abrignani, S., Chien, D., Rosa, D., Pileri, P., Ray, R., Di Bisceglie, A.M., Rinella, P., Hill, H., Wolff, M.C., Schultze, V., Han, J.H., Scharschmidt, B., and Belshe, R.B. (2010). Safety and immunogenicity of HCV E1E2 vaccine adjuvanted with MF59 administered to healthy adults. *Vaccine* 28, 6367-6373.

G

Gale, M., Jr., and Foy, E.M. (2005). Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus. *Nature* **436**, 939-945.

Gallay, P.A., and Lin, K. (2013). Profile of alisporivir and its potential in the treatment of hepatitis C. *Drug Des Devel Ther* **7**, 105-115.

Gardner, J.P., Durso, R.J., Arrigale, R.R., Donovan, G.P., Maddon, P.J., Dragic, T., and Olson, W.C. (2003). L-SIGN (CD 209L) is a liver-specific capture receptor for hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 4498-4503.

Garrone, P., Fluckiger, A.C., Mangeot, P.E., Gauthier, E., Dupeyrot-Lacas, P., Mancip, J., Cangialosi, A., Du Chene, I., LeGrand, R., Mangeot, I., Lavillette, D., Bellier, B., Cosset, F.L., Tangy, F., Klatzmann, D., and Dalba, C. (2011). A prime-boost strategy using virus-like particles pseudotyped for HCV proteins triggers broadly neutralizing antibodies in macaques. *Sci Transl Med* **3**, 94ra71.

Gastaminza, P., Cheng, G., Wieland, S., Zhong, J., Liao, W., and Chisari, F.V. (2008). Cellular determinants of hepatitis C virus assembly, maturation, degradation, and secretion. *J Virol* **82**, 2120-2129.

Gastaminza, P., Kapadia, S.B., and Chisari, F.V. (2006). Differential biophysical properties of infectious intracellular and secreted hepatitis C virus particles. *J Virol* **80**, 11074-11081.

Ge, D., Fellay, J., Thompson, A.J., Simon, J.S., Shianna, K.V., Urban, T.J., Heinzen, E.L., Qiu, P., Bertelsen, A.H., Muir, A.J., Sulkowski, M., McHutchison, J.G., and Goldstein, D.B. (2009). Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* **461**, 399-401.

Gebert, L.F., Rebhan, M.A., Crivelli, S.E., Denzler, R., Stoffel, M., and Hall, J. (2013). Miravirsen (SPC3649) can inhibit the biogenesis of miR-122. *Nucleic Acids Res.* [Epub ahead of print]

Gentsch, J., Brohm, C., Steinmann, E., Friesland, M., Menzel, N., Vieyres, G., Perin, P.M., Frentzen, A., Kaderali, L., and Pietschmann, T. (2013). hepatitis c Virus p7 is critical for capsid assembly and envelopment. *PLoS Pathog* **9**, e1003355.

Gerlach, J.T., Diepolder, H.M., Jung, M.C., Gruener, N.H., Schraut, W.W., Zachoval, R., Hoffmann, R., Schirren, C.A., Santantonio, T., and Pape, G.R. (1999). Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus-specific CD4(+) T-cell response in acute hepatitis C. *Gastroenterology* **117**, 933-941.

Ginsberg, H.N., and Fisher, E.A. (2009). The ever-expanding role of degradation in the regulation of apolipoprotein B metabolism. *J Lipid Res* **50 Suppl**, S162-166.

Références

- Gonzales, J.C., Gordts, P.L., Foley, E.M., and Esko, J.D. (2013). Apolipoproteins E and AV mediate lipoprotein clearance by hepatic proteoglycans. *J Clin Invest* 123, 2742-2751.
- Gottwein, J.M., Jensen, T.B., Mathiesen, C.K., Meuleman, P., Serre, S.B., Lademann, J.B., Ghanem, L., Scheel, T.K., Leroux-Roels, G., and Bukh, J. (2011). Development and application of hepatitis C reporter viruses with genotype 1 to 7 core-nonstructural protein 2 (NS2) expressing fluorescent proteins or luciferase in modified JFH1 NS5A. *J Virol* 85, 8913-8928.
- Gouklani, H., Bull, R.A., Beyer, C., Coulibaly, F., Gowans, E.J., Drummer, H.E., Netter, H.J., White, P.A., and Haqshenas, G. (2012). Hepatitis C virus nonstructural protein 5B is involved in virus morphogenesis. *J Virol* 86, 5080-5088.
- Gouttenoire, J., Roingard, P., Penin, F., and Moradpour, D. (2010). Amphipathic alpha-helix AH2 is a major determinant for the oligomerization of hepatitis C virus nonstructural protein 4B. *J Virol* 84, 12529-12537.
- Grafmueller, S., Billerbeck, E., Blum, H.E., Neumann-Haefelin, C., and Thimme, R. (2012). Differential antigen specificity of hepatitis C virus-specific interleukin 17- and interferon gamma-producing CD8(+) T cells during chronic infection. *J Infect Dis* 205, 1142-1146.
- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C., and Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36, 59-74.
- Grakoui, A., Wychowski, C., Lin, C., Feinstone, S.M., and Rice, C.M. (1993). Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products. *J Virol* 67, 1385-1395.
- Grobler, J.A., Markel, E.J., Fay, J.F., Graham, D.J., Simcoe, A.L., Ludmerer, S.W., Murray, E.M., Migliaccio, G., and Flores, O.A. (2003). Identification of a key determinant of hepatitis C virus cell culture adaptation in domain II of NS3 helicase. *J Biol Chem* 278, 16741-16746.
- 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.
- Gu, Z., Graci, J.D., Lahser, F.C., Breslin, J.J., Jung, S.P., Crona, J.H., McMonagle, P., Xia, E., Liu, S., Karp, G., Zhu, J., Huang, S., Nomeir, A., Weetall, M., Almstead, N.G., Peltz, S.W., Tong, X., Ralston, R., and Colacino, J.M. (2013). Identification of PTC725, an orally bioavailable small molecule that selectively targets the hepatitis C Virus NS4B protein. *Antimicrob Agents Chemother* 57, 3250-3261.

H

- Haid, S., Grethe, C., Dill, M.T., Heim, M., Kaderali, L., and Pietschmann, T. (2013). Isolate-dependent use of Claudins for cell entry by hepatitis C virus. *Hepatology*. [Epub ahead of print]
- Haid, S., Pietschmann, T., and Pecheur, E.I. (2009). Low pH-dependent hepatitis C virus membrane fusion depends on E2 integrity, target lipid composition, and density of virus particles. *J Biol Chem* 284, 17657-17667.
- Halliday, J., Klenerman, P., and Barnes, E. (2011). Vaccination for hepatitis C virus: closing in on an evasive target. *Expert Rev Vaccines* 10, 659-672.
- Harris, H.J., Clerte, C., Farquhar, M.J., Goodall, M., Hu, K., Rassam, P., Dosset, P., Wilson, G.K., Balfe, P., Ijzendoorn, S.C., Milhiet, P.E., and McKeating, J.A. (2013). Hepatoma polarization limits CD81 and hepatitis C virus dynamics. *Cell Microbiol* 15, 430-445.
- Harris, H.J., Davis, C., Mullins, J.G., Hu, K., Goodall, M., Farquhar, M.J., Mee, C.J., McCaffrey, K., Young, S., Drummer, H., Balfe, P., and McKeating, J.A. (2010). Claudin association with CD81 defines hepatitis C virus entry. *J Biol Chem* 285, 21092-21102.
- Harris, H.J., Farquhar, M.J., Mee, C.J., Davis, C., Reynolds, G.M., Jennings, A., Hu, K., Yuan, F., Deng, H., Hubscher, S.G., Han, J.H., Balfe, P., and McKeating, J.A. (2008). CD81 and claudin 1 coreceptor association: role in hepatitis C virus entry. *J Virol* 82, 5007-5020.
- Helle, F., Vieyres, G., Elkrief, L., Popescu, C.I., Wychowski, C., Descamps, V., Castelain, S., Roingard, P., Duverlie, G., and Dubuisson, J. (2010). Role of N-linked glycans in the functions of hepatitis C virus envelope proteins incorporated into infectious virions. *J Virol* 84, 11905-11915.
- Henke, J.I., Goergen, D., Zheng, J., Song, Y., Schuttler, C.G., Fehr, C., Junemann, C., and Niepmann, M. (2008). microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *EMBO J* 27, 3300-3310.
- Henry, S.D., Metselaar, H.J., Lonsdale, R.C., Kok, A., Haagmans, B.L., Tilanus, H.W., and van der Laan, L.J. (2006). Mycophenolic acid inhibits hepatitis C virus replication and acts in synergy with cyclosporin A and interferon-alpha. *Gastroenterology* 131, 1452-1462.
- Hijikata, M., Shimizu, Y.K., Kato, H., Iwamoto, A., Shih, J.W., Alter, H.J., Purcell, R.H., and Yoshikura, H. (1993). Equilibrium centrifugation studies of hepatitis C virus: evidence for circulating immune complexes. *J Virol* 67, 1953-1958.
- Hilgard, P., and Stockert, R. (2000). Heparan sulfate proteoglycans initiate dengue virus infection of hepatocytes. *Hepatology* 32, 1069-1077.

Hoffman, B., and Liu, Q. (2011). Hepatitis C viral protein translation: mechanisms and implications in developing antivirals. *Liver Int* 31, 1449-1467.

Hoofnagle, J.H. (1997). Hepatitis C: the clinical spectrum of disease. *Hepatology* 26, 15S-20S.

Horner, S.M., Liu, H.M., Park, H.S., Briley, J., and Gale, M., Jr. (2011). Mitochondrial-associated endoplasmic reticulum membranes (MAM) form innate immune synapses and are targeted by hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 14590-14595.

Houghton, M. (2009). The long and winding road leading to the identification of the hepatitis C virus. *J Hepatol* 51, 939-948.

Hsu, M., Zhang, J., Flint, M., Logvinoff, C., Cheng-Mayer, C., Rice, C.M., and McKeating, J.A. (2003). Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 7271-7276.

Hsu, S.H., Yeh, M.L., and Wang, S.N. (2013). New insights in recurrent HCV infection after liver transplantation. *Clin Dev Immunol* 2013, 890517.

Huang, H., Sun, F., Owen, D.M., Li, W., Chen, Y., Gale, M., Jr., and Ye, J. (2007). Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 5848-5853.

I

Icard, V., Diaz, O., Scholtes, C., Perrin-Cocon, L., Ramiere, C., Bartenschlager, R., Penin, F., Lotteau, V., and Andre, P. (2009). Secretion of hepatitis C virus envelope glycoproteins depends on assembly of apolipoprotein B positive lipoproteins. *PLoS One* 4, e4233.

J

Jacobson, I.M., McHutchison, J.G., Dusheiko, G., Di Bisceglie, A.M., Reddy, K.R., Bzowej, N.H., Marcellin, P., Muir, A.J., Ferenci, P., Flisiak, R., George, J., Rizzetto, M., Shouval, D., Sola, R., Terg, R.A., Yoshida, E.M., Adda, N., Bengtsson, L., Sankoh, A.J., Kieffer, T.L., George, S., Kauffman, R.S., and Zeuzem, S. (2011). Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 364, 2405-2416.

Références

Jammart, B., Michelet, M., Pecheur, E.I., Parent, R., Bartosch, B., Zoulim, F., and Durantel, D. (2013). Very-low-density lipoprotein (VLDL)-producing and hepatitis C virus-replicating HepG2 cells secrete no more lipovirions than VLDL-deficient Huh7.5 cells. *J Virol* **87**, 5065-5080.

Janssen, H.L., Reesink, H.W., Lawitz, E.J., Zeuzem, S., Rodriguez-Torres, M., Patel, K., van der Meer, A.J., Patick, A.K., Chen, A., Zhou, Y., Persson, R., King, B.D., Kauppinen, S., Levin, A.A., and Hodges, M.R. (2013). Treatment of HCV infection by targeting microRNA. *N Engl J Med* **368**, 1685-1694.

Jeong, S.H., Qiao, M., Nascimbeni, M., Hu, Z., Rehmann, B., Murthy, K., and Liang, T.J. (2004). Immunization with hepatitis C virus-like particles induces humoral and cellular immune responses in nonhuman primates. *J Virol* **78**, 6995-7003.

Jiang, J., Cun, W., Wu, X., Shi, Q., Tang, H., and Luo, G. (2012). Hepatitis C virus attachment mediated by apolipoprotein E binding to cell surface heparan sulfate. *J Virol* **86**, 7256-7267.

Jirasko, V., Montserret, R., Lee, J.Y., Gouttenoire, J., Moradpour, D., Penin, F., and Bartenschlager, R. (2010). Structural and functional studies of nonstructural protein 2 of the hepatitis C virus reveal its key role as organizer of virion assembly. *PLoS Pathog* **6**, e1001233.

Jo, J., Aichele, U., Kersting, N., Klein, R., Aichele, P., Bisse, E., Sewell, A.K., Blum, H.E., Bartenschlager, R., Lohmann, V., and Thimme, R. (2009). Analysis of CD8+ T-cell-mediated inhibition of hepatitis C virus replication using a novel immunological model. *Gastroenterology* **136**, 1391-1401.

K

Kaito, M., Watanabe, S., Tsukiyama-Kohara, K., Yamaguchi, K., Kobayashi, Y., Konishi, M., Yokoi, M., Ishida, S., Suzuki, S., and Kohara, M. (1994). Hepatitis C virus particle detected by immunoelectron microscopic study. *J Gen Virol* **75** (Pt 7), 1755-1760.

Kapadia, S.B., Barth, H., Baumert, T., McKeating, J.A., and Chisari, F.V. (2007). Initiation of hepatitis C virus infection is dependent on cholesterol and cooperativity between CD81 and scavenger receptor B type I. *J Virol* **81**, 374-383.

Kaplan, D.E., Sugimoto, K., Newton, K., Valiga, M.E., Ikeda, F., Aytaman, A., Nunes, F.A., Lucey, M.R., Vance, B.A., Vonderheide, R.H., Reddy, K.R., McKeating, J.A., and Chang, K.M. (2007). Discordant role of CD4 T-cell response relative to neutralizing antibody and CD8 T-cell responses in acute hepatitis C. *Gastroenterology* **132**, 654-666.

Références

- Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Furusaka, A., Tokushige, K., Mizokami, M., and Wakita, T. (2003). Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. *Gastroenterology* 125, 1808-1817.
- Kaul, A., Stauffer, S., Berger, C., Pertel, T., Schmitt, J., Kallis, S., Zayas, M., Lohmann, V., Luban, J., and Bartenschlager, R. (2009). Essential role of cyclophilin A for hepatitis C virus replication and virus production and possible link to polyprotein cleavage kinetics. *PLoS Pathog* 5, e1000546.
- 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., and Fong, S.K. (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., Li, T.K., Xia, J., Gal-Tanamy, M., Olson, O., Li, S.H., Patel, A.H., Ball, J.K., Lemon, S.M., and Fong, S.K. (2008). Definition of a conserved immunodominant domain on hepatitis C virus E2 glycoprotein by neutralizing human monoclonal antibodies. *J Virol* 82, 6061-6066.
- 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.
- Keck, Z., Wang, W., Wang, Y., Lau, P., Carlsen, T.H., Prentoe, J., Xia, J., Patel, A.H., Bukh, J., and Fong, S.K. (2013). Cooperativity in virus neutralization by human monoclonal antibodies to two adjacent regions located at the amino terminus of hepatitis C virus E2 glycoprotein. *J Virol* 87, 37-51.
- Keck, Z.Y., Li, T.K., Xia, J., Bartosch, B., Cosset, F.L., Dubuisson, J., and Fong, S.K. (2005). Analysis of a highly flexible conformational immunogenic domain a in hepatitis C virus E2. *J Virol* 79, 13199-13208.
- Keck, Z.Y., Xia, J., Wang, Y., Wang, W., Krey, T., Prentoe, J., Carlsen, T., Li, A.Y., Patel, A.H., Lemon, S.M., Bukh, J., Rey, F.A., and Fong, S.K. (2012). Human monoclonal antibodies to a novel cluster of conformational epitopes on HCV E2 with resistance to neutralization escape in a genotype 2a isolate. *PLoS Pathog* 8, e1002653.
- Khattab, M.A., Ferenci, P., Hadziyannis, S.J., Colombo, M., Manns, M.P., Almasio, P.L., Esteban, R., Abdo, A.A., Harrison, S.A., Ibrahim, N., Cacoub, P., Eslam, M., and Lee, S.S. (2011). Management of hepatitis C virus genotype 4: recommendations of an international expert panel. *J Hepatol* 54, 1250-1262.
- Kneteman, N.M., Howe, A.Y., Gao, T., Lewis, J., Pevear, D., Lund, G., Douglas, D., Mercer, D.F., Tyrrell, D.L., Immermann, F., Chaudhary, I., Speth, J., Villano, S.A., O'Connell, J., and Collett, M. (2009). HCV796:

Références

A selective nonstructural protein 5B polymerase inhibitor with potent anti-hepatitis C virus activity in vitro, in mice with chimeric human livers, and in humans infected with hepatitis C virus. *Hepatology* 49, 745-752.

Kobayashi, M., Bennett, M.C., Bercot, T., and Singh, I.R. (2006). Functional analysis of hepatitis C virus envelope proteins, using a cell-cell fusion assay. *J Virol* 80, 1817-1825.

Koutsoudakis, G., Kaul, A., Steinmann, E., Kallis, S., Lohmann, V., Pietschmann, T., and Bartenschlager, R. (2006). Characterization of the early steps of hepatitis C virus infection by using luciferase reporter viruses. *J Virol* 80, 5308-5320.

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., England, P., Persson, M.A., Martin, A., and Rey, F.A. (2010). The disulfide bonds in glycoprotein E2 of hepatitis C virus reveal the tertiary organization of the molecule. *PLoS Pathog* 6, e1000762.

Krey, T., Meola, A., Keck, Z.Y., Damier-Piolle, L., Fong, S.K., and Rey, F.A. (2013). Structural basis of HCV neutralization by human monoclonal antibodies resistant to viral neutralization escape. *PLoS Pathog* 9, e1003364.

Krieger, M. (2001). Scavenger receptor class B type I is a multiligand HDL receptor that influences diverse physiologic systems. *J Clin Invest* 108, 793-797.

Krieger, N., Lohmann, V., and Bartenschlager, R. (2001). Enhancement of hepatitis C virus RNA replication by cell culture-adaptive mutations. *J Virol* 75, 4614-4624.

Krieger, S.E., Zeisel, M.B., Davis, C., Thumann, C., Harris, H.J., Schnober, E.K., Mee, C., Soulier, E., Royer, C., Lambotin, M., Grunert, F., Dao Thi, V.L., Dreux, M., Cosset, F.L., McKeating, J.A., Schuster, C., and Baumert, T.F. (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.

L

Lacek, K., Vercauteren, K., Grzyb, K., Naddeo, M., Verhoye, L., Slowikowski, M.P., Fafi-Kremer, S., Patel, A.H., Baumert, T.F., Folgari, A., Leroux-Roels, G., Cortese, R., Meuleman, P., and Nicosia, A. (2012). Novel human SR-BI antibodies prevent infection and dissemination of HCV in vitro and in humanized mice. *J Hepatol* 57, 17-23.

Lambotin, M., Raghuraman, S., Stoll-Keller, F., Baumert, T.F., and Barth, H. (2010). A look behind closed doors: interaction of persistent viruses with dendritic cells. *Nat Rev Microbiol* 8, 350-360.

Lavanchy, D. (2011). Evolving epidemiology of hepatitis C virus. *Clin Microbiol Infect* 17, 107-115.

Références

- Lavillette, D., Bartosch, B., Nourrisson, D., Verney, G., Cosset, F.L., Penin, F., and Pecheur, E.I. (2006). Hepatitis C virus glycoproteins mediate low pH-dependent membrane fusion with liposomes. *J Biol Chem* **281**, 3909-3917.
- Lavillette, D., Morice, Y., Germanidis, G., Donot, P., Soulier, A., Pagkalos, E., Sakellariou, G., Intrator, L., Bartosch, B., Pawlotsky, J.M., and Cosset, F.L. (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.
- Lavillette, D., Pecheur, E.I., Donot, P., Fresquet, J., Molle, J., Corbau, R., Dreux, M., Penin, F., and Cosset, F.L. (2007). Characterization of fusion determinants points to the involvement of three discrete regions of both E1 and E2 glycoproteins in the membrane fusion process of hepatitis C virus. *J Virol* **81**, 8752-8765.
- Law J, C.C., Hockman D, Frey S, Belshe R, Wakita T, et al. (2012). Recombinant glycoproteins E1/E2 vaccine from a single HCV strain elicit broadly cross-neutralizing antibodies against major HCV genotypes in human. 9th International symposium on hepatitis C virus and related viruses.
- Law, M., Maruyama, T., Lewis, J., Giang, E., Tarr, A.W., Stamataki, Z., Gastaminza, P., Chisari, F.V., Jones, I.M., Fox, R.I., Ball, J.K., McKeating, J.A., Kneteman, N.M., and Burton, D.R. (2008). Broadly neutralizing antibodies protect against hepatitis C virus quasispecies challenge. *Nat Med* **14**, 25-27.
- Lee, L.Y., Tong, C.Y., Wong, T., and Wilkinson, M. (2012). New therapies for chronic hepatitis C infection: a systematic review of evidence from clinical trials. *Int J Clin Pract* **66**, 342-355.
- Levy, S., Todd, S.C., and Maecker, H.T. (1998). CD81 (TAPA-1): a molecule involved in signal transduction and cell adhesion in the immune system. *Annu Rev Immunol* **16**, 89-109.
- Li, K., Foy, E., Ferreon, J.C., Nakamura, M., Ferreon, A.C., Ikeda, M., Ray, S.C., Gale, M., Jr., and Lemon, S.M. (2005). Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 2992-2997.
- Lin, W., Choe, W.H., Hiasa, Y., Kamegaya, Y., Blackard, J.T., Schmidt, E.V., and Chung, R.T. (2005). Hepatitis C virus expression suppresses interferon signaling by degrading STAT1. *Gastroenterology* **128**, 1034-1041.
- Lin, W., Kim, S.S., Yeung, E., Kamegaya, Y., Blackard, J.T., Kim, K.A., Holtzman, M.J., and Chung, R.T. (2006). Hepatitis C virus core protein blocks interferon signaling by interaction with the STAT1 SH2 domain. *J Virol* **80**, 9226-9235.
- Lindenbach, B.D. (2013). Virion assembly and release. *Curr Top Microbiol Immunol* **369**, 199-218.

- 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., and Rice, C.M. (2005). Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 309, 623-626.
- Lindenbach, B.D., Meuleman, P., Ploss, A., Vanwollegem, T., Syder, A.J., McKeating, J.A., Lanford, R.E., Feinstone, S.M., Major, M.E., Leroux-Roels, G., and Rice, C.M. (2006). Cell culture-grown hepatitis C virus is infectious in vivo and can be recultured in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 3805-3809.
- Liu, S., Yang, W., Shen, L., Turner, J.R., Coyne, C.B., and Wang, T. (2009). Tight junction proteins claudin-1 and occludin control hepatitis C virus entry and are downregulated during infection to prevent superinfection. *J Virol* 83, 2011-2014.
- Liu, Z., and He, J.J. (2013). Cell-cell contact-mediated hepatitis C virus (HCV) transfer, productive infection, and replication and their requirement for HCV receptors. *J Virol* 87, 8545-8558.
- Lohmann, V., Korner, F., Koch, J., Herian, U., Theilmann, L., and Bartenschlager, R. (1999). Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 285, 110-113.
- Lok, A.S., Gardiner, D.F., Lawitz, E., Martorell, C., Everson, G.T., Ghalib, R., Reindollar, R., Rustgi, V., McPhee, F., Wind-Rotolo, M., Persson, A., Zhu, K., Dimitrova, D.I., Eley, T., Guo, T., Grasela, D.M., and Pasquinelli, C. (2012). Preliminary study of two antiviral agents for hepatitis C genotype 1. *N Engl J Med* 366, 216-224.
- Lorenz, I.C., Marcotrigiano, J., Dentzer, T.G., and Rice, C.M. (2006). Structure of the catalytic domain of the hepatitis C virus NS2-3 protease. *Nature* 442, 831-835.
- Lozach, P.Y., Amara, A., Bartosch, B., Virelizier, J.L., Arenzana-Seisdedos, F., Cosset, F.L., and Altmeyer, R. (2004). C-type lectins L-SIGN and DC-SIGN capture and transmit infectious hepatitis C virus pseudotype particles. *J Biol Chem* 279, 32035-32045.
- Lozach, P.Y., Lortat-Jacob, H., de Lacroix de Lavalette, A., Staropoli, I., Fong, S., Amara, A., Houles, C., Fieschi, F., Schwartz, O., Virelizier, J.L., Arenzana-Seisdedos, F., and Altmeyer, R. (2003). DC-SIGN and L-SIGN are high affinity binding receptors for hepatitis C virus glycoprotein E2. *J Biol Chem* 278, 20358-20366.
- Lupberger, J., Brino, L., and Baumert, T.F. (2008). RNAi: a powerful tool to unravel hepatitis C virus-host interactions within the infectious life cycle. *J Hepatol* 48, 523-525.

Références

Lupberger, J., Zeisel, M.B., Xiao, F., Thumann, C., Fofana, I., Zona, L., Davis, C., Mee, C.J., Turek, M., Gorke, S., Royer, C., Fischer, B., Zahid, M.N., Lavillette, D., Fresquet, J., Cosset, F.L., Rothenberg, S.M., Pietschmann, T., Patel, A.H., Pessaux, P., Doffoel, M., Raffelsberger, W., Poch, O., McKeating, J.A., Brino, L., and Baumert, T.F. (2011). EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy. *Nat Med* 17, 589-595.

Lusis, A.J., and Pajukanta, P. (2008). A treasure trove for lipoprotein biology. *Nat Genet* 40, 129-130.

M

Ma, Y., Anantpadma, M., Timpe, J.M., Shanmugam, S., Singh, S.M., Lemon, S.M., and Yi, M. (2011). Hepatitis C virus NS2 protein serves as a scaffold for virus assembly by interacting with both structural and nonstructural proteins. *J Virol* 85, 86-97.

Machado, M.V., and Cortez-Pinto, H. (2009). Insulin resistance and steatosis in chronic hepatitis C. *Ann Hepatol* 8 Suppl 1, S67-75.

Machida, K., Kondo, Y., Huang, J.Y., Chen, Y.C., Cheng, K.T., Keck, Z., Fong, S., Dubuisson, J., Sung, V.M., and Lai, M.M. (2008). Hepatitis C virus (HCV)-induced immunoglobulin hypermutation reduces the affinity and neutralizing activities of antibodies against HCV envelope protein. *J Virol* 82, 6711-6720.

Maillard, P., Huby, T., Andreo, U., Moreau, M., Chapman, J., and Budkowska, A. (2006). The interaction of natural hepatitis C virus with human scavenger receptor SR-BI/Cla1 is mediated by ApoB-containing lipoproteins. *FASEB J* 20, 735-737.

Mancone, C., Steindler, C., Santangelo, L., Simonte, G., Vlassi, C., Longo, M.A., D'Offizi, G., Di Giacomo, C., Pucillo, L.P., Amicone, L., Tripodi, M., and Alonzi, T. (2011). Hepatitis C virus production requires apolipoprotein A-I and affects its association with nascent low-density lipoproteins. *Gut* 60, 378-386.

Martell, M., Esteban, J.I., Quer, J., Genesca, J., Weiner, A., Esteban, R., Guardia, J., and Gomez, J. (1992). Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *J Virol* 66, 3225-3229.

Martin, D.N., and Uprichard, S.L. (2013). Identification of transferrin receptor 1 as a hepatitis C virus entry factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 10777-10782.

Masaki, T., Suzuki, R., Murakami, K., Aizaki, H., Ishii, K., Murayama, A., Date, T., Matsuura, Y., Miyamura, T., Wakita, T., and Suzuki, T. (2008). Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus particles. *J Virol* 82, 7964-7976.

Références

- McLauchlan, J., Lemberg, M.K., Hope, G., and Martoglio, B. (2002). Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *EMBO J* 21, 3980-3988.
- Meertens, L., Bertaux, C., Cukierman, L., Cormier, E., Lavillette, D., Cosset, F.L., and Dragic, T. (2008). The tight junction proteins claudin-1, -6, and -9 are entry cofactors for hepatitis C virus. *J Virol* 82, 3555-3560.
- Meertens, L., Bertaux, C., and Dragic, T. (2006). Hepatitis C virus entry requires a critical postinternalization step and delivery to early endosomes via clathrin-coated vesicles. *J Virol* 80, 11571-11578.
- Meex, S.J., Andreo, U., Sparks, J.D., and Fisher, E.A. (2011). Huh-7 or HepG2 cells: which is the better model for studying human apolipoprotein-B100 assembly and secretion? *J Lipid Res* 52, 152-158.
- Mercer, D.F., Schiller, D.E., Elliott, J.F., Douglas, D.N., Hao, C., Rinfret, A., Addison, W.R., Fischer, K.P., Churchill, T.A., Lakey, J.R., Tyrrell, D.L., and Kneteman, N.M. (2001). Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat Med* 7, 927-933.
- Merz, A., Long, G., Hiet, M.S., Brugger, B., Chlanda, P., Andre, P., Wieland, F., Krijnse-Locker, J., and Bartenschlager, R. (2011). Biochemical and morphological properties of hepatitis C virus particles and determination of their lipidome. *J Biol Chem* 286, 3018-3032.
- Meuleman, P., Bukh, J., Verhoye, L., Farhoudi, A., Vanwolleghem, T., Wang, R.Y., Desombere, I., Alter, H., Purcell, R.H., and Leroux-Roels, G. (2011). In vivo evaluation of the cross-genotype neutralizing activity of polyclonal antibodies against hepatitis C virus. *Hepatology* 53, 755-762.
- Meuleman, P., Catanese, M.T., Verhoye, L., Desombere, I., Farhoudi, A., Jones, C.T., Sheahan, T., Grzyb, K., Cortese, R., Rice, C.M., Leroux-Roels, G., and Nicosia, A. (2012). A human monoclonal antibody targeting scavenger receptor class B type I precludes hepatitis C virus infection and viral spread in vitro and in vivo. *Hepatology* 55, 364-372.
- 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.
- Meunier, J.C., Engle, R.E., Faulk, K., Zhao, M., Bartosch, B., Alter, H., Emerson, S.U., Cosset, F.L., Purcell, R.H., and Bukh, J. (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, 4560-4565.

Références

- Meunier, J.C., Gottwein, J.M., Houghton, M., Russell, R.S., Emerson, S.U., Bukh, J., and Purcell, R.H. (2011). Vaccine-induced cross-genotype reactive neutralizing antibodies against hepatitis C virus. *J Infect Dis* 204, 1186-1190.
- Meunier, J.C., Russell, R.S., Engle, R.E., Faulk, K.N., Purcell, R.H., and Emerson, S.U. (2008a). Apolipoprotein c1 association with hepatitis C virus. *J Virol* 82, 9647-9656.
- Meunier, J.C., Russell, R.S., Goossens, V., Priem, S., Walter, H., Depla, E., Union, A., Faulk, K.N., Bukh, J., Emerson, S.U., and Purcell, R.H. (2008b). Isolation and characterization of broadly neutralizing human monoclonal antibodies to the e1 glycoprotein of hepatitis C virus. *J Virol* 82, 966-973.
- Meylan, E., Curran, J., Hofmann, K., Moradpour, D., Binder, M., Bartenschlager, R., and Tschopp, J. (2005). Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* 437, 1167-1172.
- Michta, M.L., Hopcraft, S.E., Narbus, C.M., Kratovac, Z., Israelow, B., Sourisseau, M., and Evans, M.J. (2010). Species-specific regions of occludin required by hepatitis C virus for cell entry. *J Virol* 84, 11696-11708.
- Miyanari, Y., Atsuzawa, K., Usuda, N., Watashi, K., Hishiki, T., Zayas, M., Bartenschlager, R., Wakita, T., Hijikata, M., and Shimotohno, K. (2007). The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol* 9, 1089-1097.
- Molina, S., Castet, V., Fournier-Wirth, C., Pichard-Garcia, L., Avner, R., Harats, D., Roitelman, J., Barbaras, R., Graber, P., Ghera, P., Smolarsky, M., Funaro, A., Malavasi, F., Larrey, D., Coste, J., Fabre, J.M., Sa-Cunha, A., and Maurel, P. (2007). The low-density lipoprotein receptor plays a role in the infection of primary human hepatocytes by hepatitis C virus. *J Hepatol* 46, 411-419.
- Monazahian, M., Bohme, I., Bonk, S., Koch, A., Scholz, C., Grethe, S., and Thomssen, R. (1999). Low density lipoprotein receptor as a candidate receptor for hepatitis C virus. *J Med Virol* 57, 223-229.
- Moradpour, D., Gosert, R., Egger, D., Penin, F., Blum, H.E., and Bienz, K. (2003). Membrane association of hepatitis C virus nonstructural proteins and identification of the membrane alteration that harbors the viral replication complex. *Antiviral Res* 60, 103-109.
- Moradpour, D., Penin, F., and Rice, C.M. (2007). Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Microbiol* 5, 453-463.

Références

Morikawa, K., Zhao, Z., Date, T., Miyamoto, M., Murayama, A., Akazawa, D., Tanabe, J., Sone, S., and Wakita, T. (2007). The roles of CD81 and glycosaminoglycans in the adsorption and uptake of infectious HCV particles. *J Med Virol* 79, 714-723.

Muhlberger, N., Schwarzer, R., Lettmeier, B., Sroczynski, G., Zeuzem, S., and Siebert, U. (2009). HCV-related burden of disease in Europe: a systematic assessment of incidence, prevalence, morbidity, and mortality. *BMC Public Health* 9, 34.

Murata, K., Lechmann, M., Qiao, M., Gunji, T., Alter, H.J., and Liang, T.J. (2003). Immunization with hepatitis C virus-like particles protects mice from recombinant hepatitis C virus-vaccinia infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 6753-6758.

Murray, C.L., Jones, C.T., and Rice, C.M. (2008). Architects of assembly: roles of Flaviviridae non-structural proteins in virion morphogenesis. *Nat Rev Microbiol* 6, 699-708.

Murray, C.L., and Rice, C.M. (2011). Turning Hepatitis C into a Real Virus. *Annual Review of Microbiology* 65, 307-327.

N

Nabel, G.J. (2013). Designing tomorrow's vaccines. *N Engl J Med* 368, 551-560.

Nahmias, Y., Goldwasser, J., Casali, M., van Poll, D., Wakita, T., Chung, R.T., and Yarmush, M.L. (2008). Apolipoprotein B-dependent hepatitis C virus secretion is inhibited by the grapefruit flavonoid naringenin. *Hepatology* 47, 1437-1445.

Narbus, C.M., Israelow, B., Sourisseau, M., Michta, M.L., Hopcraft, S.E., Zeiner, G.M., and Evans, M.J. (2011). HepG2 cells expressing microRNA miR-122 support the entire hepatitis C virus life cycle. *J Virol* 85, 12087-12092.

Neumann, U.P., Biermer, M., Eurich, D., Neuhaus, P., and Berg, T. (2010). Successful prevention of hepatitis C virus (HCV) liver graft reinfection by silibinin mono-therapy. *J Hepatol* 52, 951-952.

Nielsen, S.U., Bassendine, M.F., Burt, A.D., Martin, C., Pumeechockchai, W., and Toms, G.L. (2006). Association between hepatitis C virus and very-low-density lipoprotein (VLDL)/LDL analyzed in iodixanol density gradients. *J Virol* 80, 2418-2428.

Nieva, J.L., Madan, V., and Carrasco, L. (2012). Viroporins: structure and biological functions. *Nat Rev Microbiol* 10, 563-574.

Références

Nitta, S., Sakamoto, N., Nakagawa, M., Kakinuma, S., Mishima, K., Kusano-Kitazume, A., Kiyohashi, K., Murakawa, M., Nishimura-Sakurai, Y., Azuma, S., Tasaka-Fujita, M., Asahina, Y., Yoneyama, M., Fujita, T., and Watanabe, M. (2013). Hepatitis C virus NS4B protein targets STING and abrogates RIG-I-mediated type I interferon-dependent innate immunity. *Hepatology* 57, 46-58.

O

Olsen, D.B., Davies, M.E., Handt, L., Koeplinger, K., Zhang, N.R., Ludmerer, S.W., Graham, D., Liverton, N., MacCoss, M., Hazuda, D., and Carroll, S.S. (2011). Sustained viral response in a hepatitis C virus-infected chimpanzee via a combination of direct-acting antiviral agents. *Antimicrob Agents Chemother* 55, 937-939.

Op De Beeck, A., Voisset, C., Bartosch, B., Ciczora, Y., Cocquerel, L., Keck, Z., Fong, S., Cosset, F.L., and Dubuisson, J. (2004). Characterization of functional hepatitis C virus envelope glycoproteins. *J Virol* 78, 2994-3002.

Osburn, W.O., Fisher, B.E., Dowd, K.A., Urban, G., Liu, L., Ray, S.C., Thomas, D.L., and Cox, A.L. (2010). Spontaneous control of primary hepatitis C virus infection and immunity against persistent reinfection. *Gastroenterology* 138, 315-324.

OuYang, B., Xie, S., Berardi, M.J., Zhao, X., Dev, J., Yu, W., Sun, B., and Chou, J.J. (2013). Unusual architecture of the p7 channel from hepatitis C virus. *Nature* 498, 521-525.

Owen, D.M., Huang, H., Ye, J., and Gale, M., Jr. (2009). Apolipoprotein E on hepatitis C virion facilitates infection through interaction with low-density lipoprotein receptor. *Virology* 394, 99-108.

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., Tarr, A.W., Keck, Z.Y., Li, T.K., Witteveldt, J., Adair, R., Fong, S.K., Ball, J.K., and Patel, A.H. (2008). Broadly neutralizing human monoclonal antibodies to the hepatitis C virus E2 glycoprotein. *J Gen Virol* 89, 653-659.

P

Pan, Q., de Ruiter, P.E., Metselaar, H.J., Kwekkeboom, J., de Jonge, J., Tilanus, H.W., Janssen, H.L., and van der Laan, L.J. (2012). Mycophenolic acid augments interferon-stimulated gene expression and inhibits hepatitis C Virus infection in vitro and in vivo. *Hepatology* 55, 1673-1683.

Références

- Pantua, H., Diao, J., Ultsch, M., Hazen, M., Mathieu, M., McCutcheon, K., Takeda, K., Date, S., Cheung, T.K., Phung, Q., Hass, P., Arnott, D., Hongo, J.A., Matthews, D.J., Brown, A., Patel, A.H., Kelley, R.F., Eigenbrot, C., and Kapadia, S.B. (2013). Glycan shifting on hepatitis C virus (HCV) E2 glycoprotein is a mechanism for escape from broadly neutralizing antibodies. *J Mol Biol* 425, 1899-1914.
- Park, J.H., Park, S., Yang, J.S., Kwon, O.S., Kim, S., and Jang, S.K. (2013). Discovery of cellular proteins required for the early steps of HCV infection using integrative genomics. *PLoS One* 8, e60333.
- Pasha, H.F., Radwan, M.I., Hagrass, H.A., Tantawy, E.A., and Emara, M.H. (2013). Cytokines genes polymorphisms in chronic hepatitis C: impact on susceptibility to infection and response to therapy. *Cytokine* 61, 478-484.
- Pawlotsky, J.M. (2013). NS5A inhibitors in the treatment of hepatitis C. *J Hepatol* 59, 375-382.
- Pecheur, E.I., Diaz, O., Molle, J., Icard, V., Bonnafous, P., Lambert, O., and Andre, P. (2010). Morphological characterization and fusion properties of triglyceride-rich lipoproteins obtained from cells transduced with hepatitis C virus glycoproteins. *J Biol Chem* 285, 25802-25811.
- Penin, F., Dubuisson, J., Rey, F.A., Moradpour, D., and Pawlotsky, J.M. (2004). Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology* 39, 5-19.
- Pestka, J.M., Zeisel, M.B., Blaser, E., Schurmann, P., Bartosch, B., Cosset, F.L., Patel, A.H., Meisel, H., Baumert, J., Viazov, S., Rispeter, K., Blum, H.E., Roggendorf, M., and Baumert, T.F. (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.
- Pietschmann, T., Kaul, A., Koutsoudakis, G., Shavinskaya, A., Kallis, S., Steinmann, E., Abid, K., Negro, F., Dreux, M., Cosset, F.L., and Bartenschlager, R. (2006). Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 7408-7413.
- Pileri, P., Uematsu, Y., Campagnoli, S., Galli, G., Falugi, F., Petracca, R., Weiner, A.J., Houghton, M., Rosa, D., Grandi, G., and Abrignani, S. (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.
- Pohlmann, S., Zhang, J., Baribaud, F., Chen, Z., Leslie, G.J., Lin, G., Granelli-Piperno, A., Doms, R.W., Rice, C.M., and McKeating, J.A. (2003). Hepatitis C virus glycoproteins interact with DC-SIGN and DC-SIGNR. *J Virol* 77, 4070-4080.

Poordad, F., McCone, J., Jr., Bacon, B.R., Bruno, S., Manns, M.P., Sulkowski, M.S., Jacobson, I.M., Reddy, K.R., Goodman, Z.D., Boparai, N., DiNubile, M.J., Sniukiene, V., Brass, C.A., Albrecht, J.K., and Bronowicki, J.P. (2011). Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med* **364**, 1195-1206.

Popescu, C.I., Callens, N., Trinel, D., Roingeard, P., Moradpour, D., Descamps, V., Duverlie, G., Penin, F., Heliot, L., Rouille, Y., and Dubuisson, J. (2011). NS2 protein of hepatitis C virus interacts with structural and non-structural proteins towards virus assembly. *PLoS Pathog* **7**, e1001278.

Prentoe, J., Jensen, T.B., Meuleman, P., Serre, S.B., Scheel, T.K., Leroux-Roels, G., Gottwein, J.M., and Bukh, J. (2011). Hypervariable region 1 differentially impacts viability of hepatitis C virus strains of genotypes 1 to 6 and impairs virus neutralization. *J Virol* **85**, 2224-2234.

Pungpapong, S., Aqel, B.A., Koning, L., Murphy, J.L., Henry, T.M., Ryland, K.L., Yataco, M.L., Satyanarayana, R., Rosser, B.G., Vargas, H.E., Charlton, M.R., and Keaveny, A.P. (2013). Multicenter experience using telaprevir or boceprevir with peginterferon and ribavirin to treat hepatitis C genotype 1 after liver transplantation. *Liver Transpl* **19**, 690-700.

Pybus, O.G., Drummond, A.J., Nakano, T., Robertson, B.H., and Rambaut, A. (2003). The epidemiology and iatrogenic transmission of hepatitis C virus in Egypt: a Bayesian coalescent approach. *Mol Biol Evol* **20**, 381-387.

Q

Quast, T., Eppler, F., Semmling, V., Schild, C., Homsy, Y., Levy, S., Lang, T., Kurts, C., and Kolanus, W. (2011). CD81 is essential for the formation of membrane protrusions and regulates Rac1-activation in adhesion-dependent immune cell migration. *Blood* **118**, 1818-1827.

R

Rabenstein, D.L. (2002). Heparin and heparan sulfate: structure and function. *Nat Prod Rep* **19**, 312-331.

Raghuraman, S., Park, H., Osburn, W.O., Winkelstein, E., Edlin, B.R., and Rehermann, B. (2012). Spontaneous clearance of chronic hepatitis C virus infection is associated with appearance of neutralizing antibodies and reversal of T-cell exhaustion. *J Infect Dis* **205**, 763-771.

Rai, R., and Deval, J. (2011). New opportunities in anti-hepatitis C virus drug discovery: targeting NS4B. *Antiviral Res* **90**, 93-101.

Rehermann, B. (2009). Hepatitis C virus versus innate and adaptive immune responses: a tale of coevolution and coexistence. *J Clin Invest* 119, 1745-1754.

Reyes-Del Valle, J., de la Fuente, C., Turner, M.A., Springfield, C., Apte-Sengupta, S., Frenzke, M.E., Forest, A., Whidby, J., Marcotrigiano, J., Rice, C.M., and Cattaneo, R. (2012). Broadly Neutralizing Immune Responses against Hepatitis C Virus Induced by Vectored Measles Viruses and a Recombinant Envelope Protein Booster. *J Virol* 86, 11558-11566.

Reynolds, G.M., Harris, H.J., Jennings, A., Hu, K., Grove, J., Lalor, P.F., Adams, D.H., Balfe, P., Hubscher, S.G., and McKeating, J.A. (2008). Hepatitis C virus receptor expression in normal and diseased liver tissue. *Hepatology* 47, 418-427.

Roberts, E.A., and Yeung, L. (2002). Maternal-infant transmission of hepatitis C virus infection. *Hepatology* 36, S106-113.

Roccasecca, R., Ansuini, H., Vitelli, A., Meola, A., Scarselli, E., Acali, S., Pezzanera, M., Ercole, B.B., McKeating, J., Yagnik, A., Lahm, A., Tramontano, A., Cortese, R., and Nicosia, A. (2003). Binding of the hepatitis C virus E2 glycoprotein to CD81 is strain specific and is modulated by a complex interplay between hypervariable regions 1 and 2. *J Virol* 77, 1856-1867.

Rocha-Perugini, V., Montpellier, C., Delgrange, D., Wychowski, C., Helle, F., Pillez, A., Drobecq, H., Le Naour, F., Charrin, S., Levy, S., Rubinstein, E., Dubuisson, J., and Cocquerel, L. (2008). The CD81 partner EWI-2wint inhibits hepatitis C virus entry. *PLoS One* 3, e1866.

Romero-Brey, I., Merz, A., Chiramel, A., Lee, J.Y., Chlanda, P., Haselman, U., Santarella-Mellwig, R., Habermann, A., Hoppe, S., Kallis, S., Walther, P., Antony, C., Krijnse-Locker, J., and Bartenschlager, R. (2012). Three-dimensional architecture and biogenesis of membrane structures associated with hepatitis C virus replication. *PLoS Pathog* 8, e1003056.

Rosen, H.R., Shackleton, C.R., Higa, L., Gralnek, I.M., Farmer, D.A., McDiarmid, S.V., Holt, C., Lewin, K.J., Busuttil, R.W., and Martin, P. (1997). Use of OKT3 is associated with early and severe recurrence of hepatitis C after liver transplantation. *Am J Gastroenterol* 92, 1453-1457.

S

Sainz, B., Jr., Barretto, N., Martin, D.N., Hiraga, N., Imamura, M., Hussain, S., Marsh, K.A., Yu, X., Chayama, K., Alrefai, W.A., and Uprichard, S.L. (2012). Identification of the Niemann-Pick C1-like 1 cholesterol absorption receptor as a new hepatitis C virus entry factor. *Nat Med* 18, 281-285.

Références

- Sandgren, E.P., Palmiter, R.D., Heckel, J.L., Daugherty, C.C., Brinster, R.L., and Degen, J.L. (1991). Complete hepatic regeneration after somatic deletion of an albumin-plasminogen activator transgene. *Cell* 66, 245-256.
- Sandrin, V., Boulanger, P., Penin, F., Granier, C., Cosset, F.L., and Bartosch, B. (2005). Assembly of functional hepatitis C virus glycoproteins on infectious pseudoparticles occurs intracellularly and requires concomitant incorporation of E1 and E2 glycoproteins. *J Gen Virol* 86, 3189-3199.
- 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.
- Scheel, T.K., Gottwein, J.M., Mikkelsen, L.S., Jensen, T.B., and Bukh, J. (2011). Recombinant HCV variants with NS5A from genotypes 1-7 have different sensitivities to an NS5A inhibitor but not interferon-alpha. *Gastroenterology* 140, 1032-1042.
- Scholtes, C., Ramiere, C., Rainteau, D., Perrin-Cocon, L., Wolf, C., Humbert, L., Carreras, M., Guironnet-Paquet, A., Zoulim, F., Bartenschlager, R., Lotteau, V., Andre, P., and Diaz, O. (2012). High plasma level of nucleocapsid-free envelope glycoprotein-positive lipoproteins in hepatitis C patients. *Hepatology* 56, 39-48.
- Schvoerer, E., Soulier, E., Royer, C., Renaudin, A.C., Thumann, C., Fafi-Kremer, S., Brignon, N., Doridot, S., Meyer, N., Pinson, P., Ellero, B., Woehl-Jaegle, M.L., Meyer, C., Wolf, P., Zachary, P., Baumert, T., and Stoll-Keller, F. (2007). Early evolution of hepatitis C virus (HCV) quasispecies after liver transplant for HCV-related disease. *J Infect Dis* 196, 528-536.
- Seeff, L.B. (2002). Natural history of chronic hepatitis C. *Hepatology* 36, S35-46.
- Seeff, L.B. (2009). The history of the "natural history" of hepatitis C (1968-2009). *Liver Int* 29 *Suppl* 1, 89-99.
- Shi, Q., Jiang, J., and Luo, G. (2013). Syndecan-1 serves as the major receptor for attachment of hepatitis C virus to the surfaces of hepatocytes. *J Virol* 87, 6866-6875.
- Shoukry, N.H., Grakoui, A., Houghton, M., Chien, D.Y., Ghayeb, J., Reimann, K.A., and Walker, C.M. (2003). Memory CD8+ T cells are required for protection from persistent hepatitis C virus infection. *J Exp Med* 197, 1645-1655.
- Sievert, W., Altraif, I., Razavi, H.A., Abdo, A., Ahmed, E.A., Alomair, A., Amarapurkar, D., Chen, C.H., Dou, X., El Khayat, H., Elshazly, M., Esmat, G., Guan, R., Han, K.H., Koike, K., Largen, A., McCaughan, G., Mogawer, S., Monis, A., Nawaz, A., Piratvisuth, T., Sanai, F.M., Sharara, A.I., Sibbel, S., Sood, A., Suh,

Références

- D.J., Wallace, C., Young, K., and Negro, F. (2011). A systematic review of hepatitis C virus epidemiology in Asia, Australia and Egypt. *Liver Int* 31 *Suppl* 2, 61-80.
- Simmonds, P. (2004). Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus--15 years on. *J Gen Virol* 85, 3173-3188.
- Sourisseau, M., Michta, M.L., Zony, C., Israelow, B., Hopcraft, S.E., Narbus, C.M., Parra Martin, A., and Evans, M.J. (2013). Temporal analysis of hepatitis C virus cell entry with occludin directed blocking antibodies. *PLoS Pathog* 9, e1003244.
- Stamatakis, Z., Coates, S., Abrignani, S., Houghton, M., and McKeating, J.A. (2011). Immunization of human volunteers with hepatitis C virus envelope glycoproteins elicits antibodies that cross-neutralize heterologous virus strains. *J Infect Dis* 204, 811-813.
- Stamatakis, Z., Shannon-Lowe, C., Shaw, J., Mutimer, D., Rickinson, A.B., Gordon, J., Adams, D.H., Balfe, P., and McKeating, J.A. (2009). Hepatitis C virus association with peripheral blood B lymphocytes potentiates viral infection of liver-derived hepatoma cells. *Blood* 113, 585-593.
- Stanford, K.I., Bishop, J.R., Foley, E.M., Gonzales, J.C., Niesman, I.R., Witztum, J.L., and Esko, J.D. (2009). Syndecan-1 is the primary heparan sulfate proteoglycan mediating hepatic clearance of triglyceride-rich lipoproteins in mice. *J Clin Invest* 119, 3236-3245.
- Stapleford, K.A., and Lindenbach, B.D. (2011). Hepatitis C virus NS2 coordinates virus particle assembly through physical interactions with the E1-E2 glycoprotein and NS3-NS4A enzyme complexes. *J Virol* 85, 1706-1717.
- Stedman, C.A. (2013). Current prospects for interferon-free treatment of hepatitis C in 2012. *J Gastroenterol Hepatol* 28, 38-45.
- Steinmann, E., Penin, F., Kallis, S., Patel, A.H., Bartenschlager, R., and Pietschmann, T. (2007). Hepatitis C virus p7 protein is crucial for assembly and release of infectious virions. *PLoS Pathog* 3, e103.
- Sulkowski, M.S., Kang, M., Matining, R., Wyles, D., Johnson, V.A., Morse, G.D., Amorosa, V., Bhattacharya, D., Coughlin, K., Wong-Staal, F., and Glesby, M.J. (2013). Safety and Antiviral Activity of the HCV Entry Inhibitor ITX5061 in Treatment-Naive HCV- Infected Adults: A Randomized, Double-Blind, Phase 1b Study. *J Infect Dis*. [Epub ahead of print]
- Syder, A.J., Lee, H., Zeisel, M.B., Grove, J., Soulier, E., Macdonald, J., Chow, S., Chang, J., Baumert, T.F., McKeating, J.A., McKelvy, J., and Wong-Staal, F. (2011). Small molecule scavenger receptor BI antagonists are potent HCV entry inhibitors. *J Hepatol* 54, 48-55.

T

Tarr, A.W., Lafaye, P., Meredith, L., Damier-Piolle, L., Urbanowicz, R.A., Meola, A., Jestin, J.L., Brown, R.J., McKeating, J.A., Rey, F.A., Ball, J.K., and Krey, T. (2013). An alpaca nanobody inhibits hepatitis C virus entry and cell-to-cell transmission. *Hepatology* 58, 932-939.

Tarr, A.W., Owsianka, A.M., Jayaraj, D., Brown, R.J., Hickling, T.P., Irving, W.L., Patel, A.H., and Ball, J.K. (2007). Determination of the human antibody response to the epitope defined by the hepatitis C virus-neutralizing monoclonal antibody AP33. *J Gen Virol* 88, 2991-3001.

Teissier, E., Zandomenighi, G., Loquet, A., Lavillette, D., Lavergne, J.P., Montserret, R., Cosset, F.L., Bockmann, A., Meier, B.H., Penin, F., and Pecheur, E.I. (2011). Mechanism of inhibition of enveloped virus membrane fusion by the antiviral drug arbidol. *PLoS One* 6, e15874.

Tellinghuisen, T.L., Foss, K.L., and Treadaway, J. (2008). Regulation of hepatitis C virion production via phosphorylation of the NS5A protein. *PLoS Pathog* 4, e1000032.

Tellinghuisen, T.L., Marcotrigiano, J., and Rice, C.M. (2005). Structure of the zinc-binding domain of an essential component of the hepatitis C virus replicase. *Nature* 435, 374-379.

Thimme, R., Binder, M., and Bartenschlager, R. (2012). Failure of innate and adaptive immune responses in controlling hepatitis C virus infection. *FEMS Microbiol Rev* 36, 663-683.

Thimme, R., Bukh, J., Spangenberg, H.C., Wieland, S., Pemberton, J., Steiger, C., Govindarajan, S., Purcell, R.H., and Chisari, F.V. (2002). Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 15661-15668.

Thimme, R., Oldach, D., Chang, K.M., Steiger, C., Ray, S.C., and Chisari, F.V. (2001). Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *J Exp Med* 194, 1395-1406.

Thomssen, R., Bonk, S., Propfe, C., Heermann, K.H., Kochel, H.G., and Uy, A. (1992). Association of hepatitis C virus in human sera with beta-lipoprotein. *Med Microbiol Immunol* 181, 293-300.

Thomssen, R., Bonk, S., and Thiele, A. (1993). Density heterogeneities of hepatitis C virus in human sera due to the binding of beta-lipoproteins and immunoglobulins. *Med Microbiol Immunol* 182, 329-334.

Timpe, J.M., Stamataki, Z., Jennings, A., Hu, K., Farquhar, M.J., Harris, H.J., Schwarz, A., Desombere, I., Roels, G.L., Balfe, P., and McKeating, J.A. (2008). Hepatitis C virus cell-cell transmission in hepatoma cells in the presence of neutralizing antibodies. *Hepatology* 47, 17-24.

Références

Tomiyasu, K., Walsh, B.W., Ikewaki, K., Judge, H., and Sacks, F.M. (2001). Differential metabolism of human VLDL according to content of ApoE and ApoC-III. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21, 1494-1500.

Triyatni, M., Vergalla, J., Davis, A.R., Hadlock, K.G., Fong, S.K., and Liang, T.J. (2002). Structural features of envelope proteins on hepatitis C virus-like particles as determined by anti-envelope monoclonal antibodies and CD81 binding. *Virology* 298, 124-132.

Tscherne, D.M., Jones, C.T., Evans, M.J., Lindenbach, B.D., McKeating, J.A., and Rice, C.M. (2006). Time- and temperature-dependent activation of hepatitis C virus for low-pH-triggered entry. *J Virol* 80, 1734-1741.

U

Urbani, S., Amadei, B., Fiscaro, P., Tola, D., Orlandini, A., Sacchelli, L., Mori, C., Missale, G., and Ferrari, C. (2006). Outcome of acute hepatitis C is related to virus-specific CD4 function and maturation of antiviral memory CD8 responses. *Hepatology* 44, 126-139.

V

Vandelli, C., Renzo, F., Romano, L., Tisminetzky, S., De Palma, M., Stroffolini, T., Ventura, E., and Zanetti, A. (2004). Lack of evidence of sexual transmission of hepatitis C among monogamous couples: results of a 10-year prospective follow-up study. *Am J Gastroenterol* 99, 855-859.

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.

Vellozzi, C., Buchacz, K., Baker, R., Spradling, P.R., Richardson, J., Moorman, A., Tedaldi, E., Durham, M., Ward, J., and Brooks, J.T. (2011). Treatment of hepatitis C virus (HCV) infection in patients coinfecting with HIV in the HIV Outpatient Study (HOPS), 1999-2007. *J Viral Hepat* 18, 316-324.

Venook, A.P., Papandreou, C., Furuse, J., and de Guevara, L.L. (2010). The incidence and epidemiology of hepatocellular carcinoma: a global and regional perspective. *Oncologist* 15 Suppl 4, 5-13.

Vieyres, G., Dubuisson, J., and Patel, A.H. (2011). Characterization of antibody-mediated neutralization directed against the hypervariable region 1 of hepatitis C virus E2 glycoprotein. *J Gen Virol* 92, 494-506.

Références

Vieyres, G., Thomas, X., Descamps, V., Duverlie, G., Patel, A.H., and Dubuisson, J. (2010). Characterization of the envelope glycoproteins associated with infectious hepatitis C virus. *J Virol* **84**, 10159-10168.

Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T., and Ugolini, S. (2008). Functions of natural killer cells. *Nat Immunol* **9**, 503-510.

Voisset, C., Callens, N., Blanchard, E., Op De Beeck, A., Dubuisson, J., and Vu-Dac, N. (2005). High density lipoproteins facilitate hepatitis C virus entry through the scavenger receptor class B type I. *J Biol Chem* **280**, 7793-7799.

Voisset, C., and Dubuisson, J. (2004). Functional hepatitis C virus envelope glycoproteins. *Biol Cell* **96**, 413-420.

von Hahn, T., and Rice, C.M. (2008). Hepatitis C virus entry. *J Biol Chem* **283**, 3689-3693.

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.

W

Wakita, T., Pietschmann, T., Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., Murthy, K., Habermann, A., Krausslich, H.G., Mizokami, M., Bartenschlager, R., and Liang, T.J. (2005). Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* **11**, 791-796.

Washburn, M.L., Bility, M.T., Zhang, L., Kovalev, G.I., Buntzman, A., Frelinger, J.A., Barry, W., Ploss, A., Rice, C.M., and Su, L. (2011). A humanized mouse model to study hepatitis C virus infection, immune response, and liver disease. *Gastroenterology* **140**, 1334-1344.

Weisgraber, K.H., Rall, S.C., Jr., Mahley, R.W., Milne, R.W., Marcel, Y.L., and Sparrow, J.T. (1986). Human apolipoprotein E. Determination of the heparin binding sites of apolipoprotein E3. *J Biol Chem* **261**, 2068-2076.

Wilson, J.A., Zhang, C., Huys, A., and Richardson, C.D. (2011). Human Ago2 is required for efficient microRNA 122 regulation of hepatitis C virus RNA accumulation and translation. *J Virol* **85**, 2342-2350.

Witteveldt, J., Evans, M.J., Bitzegeio, J., Koutsoudakis, G., Owsianka, A.M., Angus, A.G., Keck, Z.Y., Fong, S.K., Pietschmann, T., Rice, C.M., and Patel, A.H. (2009). CD81 is dispensable for hepatitis C virus cell-to-cell transmission in hepatoma cells. *J Gen Virol* **90**, 48-58.

Y

Yanez-Mo, M., Barreiro, O., Gordon-Alonso, M., Sala-Valdes, M., and Sanchez-Madrid, F. (2009). Tetraspanin-enriched microdomains: a functional unit in cell plasma membranes. *Trends Cell Biol* 19, 434-446.

Yang, W., Qiu, C., Biswas, N., Jin, J., Watkins, S.C., Montelaro, R.C., Coyne, C.B., and Wang, T. (2008). Correlation of the tight junction-like distribution of Claudin-1 to the cellular tropism of hepatitis C virus. *J Biol Chem* 283, 8643-8653.

Yi, M., Villanueva, R.A., Thomas, D.L., Wakita, T., and Lemon, S.M. (2006). Production of infectious genotype 1a hepatitis C virus (Hutchinson strain) in cultured human hepatoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 2310-2315.

Yu, G.Y., Lee, K.J., Gao, L., and Lai, M.M. (2006). Palmitoylation and polymerization of hepatitis C virus NS4B protein. *J Virol* 80, 6013-6023.

Z

Zahid, M.N., Turek, M., Xiao, F., Dao Thi, V.L., Guerin, M., Fofana, I., Bachellier, P., Thompson, J., Delang, L., Neyts, J., Bankwitz, D., Pietschmann, T., Dreux, M., Cosset, F.L., Grunert, F., Baumert, T.F., and Zeisel, M.B. (2012). The postbinding activity of scavenger receptor class B type I mediates initiation of hepatitis C virus infection and viral dissemination. *Hepatology*.

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

Zeisel, M.B., Fafi-Kremer, S., Robinet, E., Habersetzer, F., Baumert, T.F., and Stoll-Keller, F. (2009). Adaptive immunity to hepatitis C virus. *Viruses* 1, 276-297.

Zeisel, M.B., Koutsoudakis, G., Schnober, E.K., Haberstroh, A., Blum, H.E., Cosset, F.L., Wakita, T., Jaeck, D., Doffoel, M., Royer, C., Soulier, E., Schvoerer, E., Schuster, C., Stoll-Keller, F., Bartenschlager, R., Pietschmann, T., Barth, H., and Baumert, T.F. (2007b). 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.

Zeisel, M.B., Lupberger, J., Fofana, I., and Baumert, T.F. (2013). Host-targeting agents for prevention and treatment of chronic hepatitis C - perspectives and challenges. *J Hepatol* 58, 375-384.

Références

- Zeuzem, S. (2008). Interferon-based therapy for chronic hepatitis C: current and future perspectives. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 5, 610-622.
- Zhang, Y.Y., Zhang, B.H., Ishii, K., and Liang, T.J. (2010). Novel function of CD81 in controlling hepatitis C virus replication. *J Virol* 84, 3396-3407.
- Zhao, X., Tang, Z.Y., Klumpp, B., Wolff-Vorbeck, G., Barth, H., Levy, S., von Weizsacker, F., Blum, H.E., and Baumert, T.F. (2002). Primary hepatocytes of *Tupaia belangeri* as a potential model for hepatitis C virus infection. *J Clin Invest* 109, 221-232.
- Zheng, A., Yuan, F., Li, Y., Zhu, F., Hou, P., Li, J., Song, X., Ding, M., and Deng, H. (2007). Claudin-6 and claudin-9 function as additional coreceptors for hepatitis C virus. *J Virol* 81, 12465-12471.
- Zhong, J., Gastaminza, P., Cheng, G., Kapadia, S., Kato, T., Burton, 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.
- Zhu, H., Wong-Staal, F., Lee, H., Syder, A., McKelvy, J., Schooley, R.T., and Wyles, D.L. (2012). Evaluation of ITX 5061, a scavenger receptor B1 antagonist: resistance selection and activity in combination with other hepatitis C virus antivirals. *J Infect Dis* 205, 656-662.
- Zona, L., Lupberger, J., Sidahmed-Adrar, N., Thumann, C., Harris, H.J., Barnes, A., Florentin, J., Tawar, R.G., Xiao, F., Turek, M., Durand, S.C., Duong, F.H., Heim, M.H., Cosset, F.L., Hirsch, I., Samuel, D., Brino, L., Zeisel, M.B., Le Naour, F., McKeating, J.A., and Baumert, T.F. (2013). HRas signal transduction promotes hepatitis C virus cell entry by triggering assembly of the host tetraspanin receptor complex. *Cell Host Microbe* 13, 302-313.

Publication n°1 : Mutations that alter use of hepatitis C virus cell entry factors mediate escape from neutralizing antibodies.

Fofana I*, Fafi-Kremer S*, Carolla P*, **Fauvelle C**, Zahid MN, Turek M, Heydmann L, Cury K, Hayer J, Combet C, Cosset FL, Pietschmann T, Hiet MS, Bartenschlager R, Habersetzer F, Doffoël M, Keck ZY, Fong SK, Zeisel MB, Stoll-Keller F, Baumert TF. (*contribution équivalente). *Gastroenterology* (2012), 143(1):223-233.

Publication n°2 : Apolipoprotein E association with hepatitis C virus particles mediates evasion from host immunity

Felmlee DJ *, **Fauvelle C***, Lefèvre M, Heydmann M, Hiet MS, Bartenschlager R, Fofana I, Habersetzer H, Milne R, Patel AH, Vercauteren K, Meuleman P, Zeisel MB, Schuster C, Fafi-Kremer S#, Baumert TF# (**contribution équivalente). *PNAS* (*submitted*)

Publication n°1

Mutations that alter use of hepatitis C virus cell entry factors mediate escape from neutralizing antibodies.

Fofana I*, Fafi-Kremer S*, Carolla P*, **Fauvelle C**, Zahid MN, Turek M, Heydmann L, Cury K, Hayer J, Combet C, Cosset FL, Pietschmann T, Hiet MS, Bartenschlager R, Habersetzer F, Doffoël M, Keck ZY, Fong SK, Zeisel MB, Stoll-Keller F, Baumert TF. (*contribution équivalente).

Gastroenterology (2012), 143(1):223-233.

Mutations That Alter Use of Hepatitis C Virus Cell Entry Factors Mediate Escape From Neutralizing Antibodies

ISABEL FOFANA,^{*,‡} SAMIRA FAFI-KREMER,^{*,‡,§} PATRIC CAROLLA,^{*,‡} CATHERINE FAUVELLE,^{*,‡} MUHAMMAD NAUMAN ZAHID,^{*,‡} MARINE TUREK,^{*,‡} LAURA HEYDMANN,^{*,‡} KARINE CURY,^{*,‡} JULIETTE HAYER,^{||} CHRISTOPHE COMBET,^{||} FRANÇOIS-LOÏC COSSET,^{||} THOMAS PIETSCHMANN,[#] MARIE-SOPHIE HIET,^{**} RALF BARTENSCHLAGER,^{**} FRANÇOIS HABERSETZER,^{*,‡,‡‡} MICHEL DOFFOËL,^{*,‡,‡‡} ZHEN-YONG KECK,^{§§} STEVEN K. H. FOUNG,^{§§} MIRJAM B. ZEISEL,^{*,‡} FRANÇOISE STOLL-KELLER,^{*,‡,§} and THOMAS F. BAUMERT^{*,‡,‡‡}

^{*}Inserm, U748, Strasbourg, France; [‡]Université de Strasbourg, Strasbourg, France; [§]Laboratoire de Virologie, ^{‡‡}Pôle Hepato-Digestif, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France; ^{||}Bases Moléculaires et Structurales des Systèmes Infectieux, UMR 5086, Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Lyon, Institut de Biologie et Chimie des Protéines, Lyon, France; ^{||}Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon1, IFR 128, Inserm U758; Ecole Normale Supérieure de Lyon, 69364 Lyon, France; [#]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, Hannover, Germany; ^{**}The Department of Infectious Diseases, Molecular Virology, Heidelberg University, Heidelberg, Germany; and ^{§§}Department of Pathology, Stanford University School of Medicine, Stanford, California

BACKGROUND & AIMS: The development of vaccines and other strategies to prevent hepatitis C virus (HCV) infection is limited by rapid viral evasion. HCV entry is the first step of infection; this process involves several viral and host factors and is targeted by host-neutralizing responses. Although the roles of host factors in HCV entry have been well characterized, their involvement in evasion of immune responses is poorly understood. We used acute infection of liver graft as a model to investigate the molecular mechanisms of viral evasion. **METHODS:** We studied factors that contribute to evasion of host immune responses using patient-derived antibodies, HCV pseudoparticles, and cell culture-derived HCV that express viral envelopes from patients who have undergone liver transplantation. These viruses were used to infect hepatoma cell lines that express different levels of HCV entry factors. **RESULTS:** By using reverse genetic analyses, we identified altered use of host-cell entry factors as a mechanism by which HCV evades host immune responses. Mutations that alter use of the CD81 receptor also allowed the virus to escape neutralizing antibodies. Kinetic studies showed that these mutations affect virus-antibody interactions during postbinding steps of the HCV entry process. Functional studies with a large panel of patient-derived antibodies showed that this mechanism mediates viral escape, leading to persistent infection in general. **CONCLUSIONS:** We identified a mechanism by which HCV evades host immune responses, in which use of cell entry factors evolves with escape from neutralizing antibodies. These findings advance our understanding of the pathogenesis of HCV infection and might be used to develop antiviral strategies and vaccines.

Keywords: Virology; Liver Disease; Tissue Culture Model; Immunity.

Hepatitis C virus (HCV) infection is a major cause of liver disease.¹ A vaccine is not available and antiviral treatment is limited by resistance and adverse effects.²

HCV-induced liver disease is a leading indication for liver transplantation (LT).³ A major limitation of LT is the universal reinfection of the liver graft with accelerated recurrence of liver disease. A strategy to prevent reinfection is lacking.³ Thus, there is an urgent unmet medical need for the development of efficient and safe antivirals and vaccines.

HCV entry is required for initiation, maintenance, and dissemination of infection. Viral entry is a key target for adaptive host responses and antiviral strategies.^{4,5} Functional studies in clinical cohorts highlight that viral entry and escape from antibody-mediated neutralization play an important role in viral persistence and liver disease.^{6–12} HCV entry is a highly orchestrated process mediated by viral envelope glycoproteins E1 and E2 and several host factors including heparan sulfate, CD81, scavenger receptor BI (SR-BI), claudin-1 (CLDN1), occludin (OCLN) (reviewed by Zeisel et al⁵), and kinases.¹³ Although the role of E1E2 in antibody-mediated neutralization has been studied intensively,^{4,5,14} the role of host factors for viral evasion in vivo is only poorly understood.

Acute graft infection is an established in vivo model to study viral evasion because viral infection and host-neutralizing responses can be monitored precisely.⁸ Viral entry and escape from host-neutralizing responses are important determinants allowing the virus to rapidly infect the liver during transplantation.⁸ However, the molecular mechanisms by which the virus evades host immunity to persistently reinfect the liver graft are unknown.

To uncover viral and host factors mediating enhanced viral entry and escape, we functionally analyzed genetically closely related prototype variants derived from a well-char-

Abbreviations used in this paper: CLDN, claudin; HCV, hepatitis C virus; HCVcc, cell culture-derived HC; HCVpp, hepatitis C virus pseudoparticles; HMAb, human monoclonal antibody; HVR, hypervariable region; LT, liver transplantation; mAb, monoclonal antibody; OCLN, occludin SR-BI, scavenger receptor class B type I; VA, variant A; VC, variant C; VL, variant L.

© 2012 by the AGA Institute
0016-5085/\$36.00

<http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2012.04.006>

acterized patient undergoing LT.⁸ In one variant, P01VL, reinfected the liver graft was characterized by high infectivity and escape from neutralizing antibodies present in autologous pretransplant serum.⁸ The other closely related variants, P01VA and P01VC, were not selected during LT and were characterized by lower infectivity and high sensitivity to neutralization by autologous pretransplant serum.⁸ Previous studies had indicated that an E2 region comprising amino acids 425–483 most likely contained mutations responsible for the phenotype of enhanced entry and viral evasion of variants reinfected the liver graft.⁸

Materials and Methods

Patients

Evolution and functional analysis of viral variants of patient P01 have been described.⁸ Anti-HCV-positive serum samples from patients undergoing transplantation and chronic HCV infection were obtained with approval from the Strasbourg University Hospital Institutional Review Board (ClinicalTrials.gov Identifiers NCT00638144 and NCT00213707).

Plasmids

Plasmids for HCV pseudoparticle (HCVpp) production of variants VL, VA, and VC have been described.⁸ E1E2-encoding sequences were used as templates for individual and combinations of mutations using the QuikChange II XL site-directed mutagenesis kit (Agilent Technologies, Massy, France). Mutations were confirmed by DNA sequence analysis (GATC Biotech, Mulhouse, France) for the desired mutation and for exclusion of unexpected residue changes in the full-length E1E2 encoding sequences. Mutated constructs were designated X#Y, where # is the residue location in H77c,¹⁵ X is the mutated amino acid, and Y is the original amino acid.

Antibodies

Monoclonal anti-E1 (11B7) and anti-E2 (AP33, IGH461, 16A6); human anti-HCV IgG^{10,16}; human monoclonal antibodies (HMAbs) CBH-2, CBH-5, CBH-23, and HC-1 have been described.^{9,17} Anti-CD81 (JS-81) was from BD Biosciences (Heidelberg, Germany), AP33 was from Genentech (San Francisco, CA), and 11B7, IGH461, and 16A6 were from Innogenetics (Ghent, Belgium).

Cell Lines

HEK 293T and Huh7.5.1 cells were cultured as described.^{10,13,16} Huh7.5.1 cells overexpressing HCV entry factors were created by stable lentiviral gene transfer of CLDN1, OCLN, SR-BI, or CD81.¹⁸ Huh7.5 stably transduced with retroviral vectors encoding for CD81- and CD13-specific short hairpin (sh) RNAs have been described.¹⁹ Receptor expression was assessed by flow cytometry.¹³

HCV Pseudoparticle and Cell Culture-Derived HCV Production, Infection, and Neutralization

Lentiviral HCVpp bearing patient-derived envelope glycoproteins were produced as described.^{8,10,20} The amount of HCVpp was normalized after quantification of human immunodeficiency virus p24 antigen expression (Innotest Human Immunodeficiency Virus Antigen mAb Kit; Innogenetics) and HCVpp entry was performed as described.^{8,10,11,16} Chimeric HCVcc

expressing patient-derived structural proteins were constructed and produced as described in the Supplementary Materials and Methods section. HCVcc infectivity was measured by determining the tissue culture infectious dose 50% (TCID₅₀)²¹ or intracellular HCV-RNA levels as described.^{13,21,22} HCVpp and HCVcc neutralization were performed as described.^{8,10,11,16}

Kinetic Assays

HCVpp kinetic assays were performed in Huh7.5.1 cells using anti-CD81 (JS-81) and anti-E2 (CBH-23) monoclonal antibodies (mAbs) as described.^{16,23}

Statistical Analysis

Statistical analysis (repeated-measures analysis of variance) was performed using SPSS 16.0 software for Windows (SPSS, Inc, Chicago, IL).

Results

HCV E2 Residues at Positions 447, 458, and 478 Confer Enhanced Viral Entry of a High-Infectivity Variant Reinfected the Liver Graft

To investigate the molecular mechanism of enhanced entry of the variant VL reinfected the liver graft, we first introduced individual mutations of region E2_{425–483}⁸ of the low-entry and neutralization-sensitive mutant VC into HCVpp expressing envelope glycoproteins of the highly infectious escape variant VL (Figure 1A). Previous studies indicated that this region most likely contains the mutations responsible for the high-infectivity phenotype of VL.⁸ After normalization of HCVpp levels by p24 antigen expression, viral entry was quantified relative to the escape variant VL. The entry level of the nonselected variant VC was 5% compared with the escape variant VL (Figure 1B). By introducing the mutations S458G and R478C into VC, chimeric HCVpp showed similar viral entry level as the paternal variant VL whereas introduction of individual or a combination of other mutations only had a partial effect (Figure 1B, Supplementary Figure 1). To explore the impact of other positions on viral entry we introduced mutations from another nonselected variant termed VA into VL (Figure 1A) and identified position F447 as an additional residue relevant for enhanced entry of the escape variant VL (Figure 1C). These results show that residues F447L, S458G, and R478C are largely responsible for the high infectivity of the escape variant VL.

Enhanced Viral Entry by Mutations F447L, 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 use of cell entry factors SR-BI, CD81, CLDN1, and OCLN, we studied viral entry of HCVpp derived from parental and chimeric variants in Huh7.5.1 cells stably overexpressing the 4 main entry factors individually (Figure 2A). Overexpression of either SR-BI, CD81, CLDN1, or OCLN did not affect the stability or proportion of other cell-surface HCV receptors (Figure 2B and data not shown).

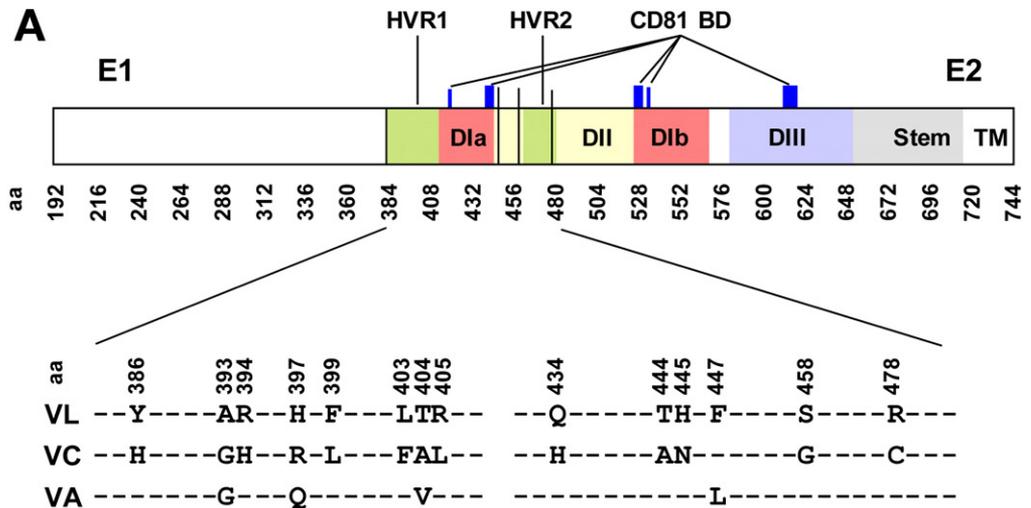
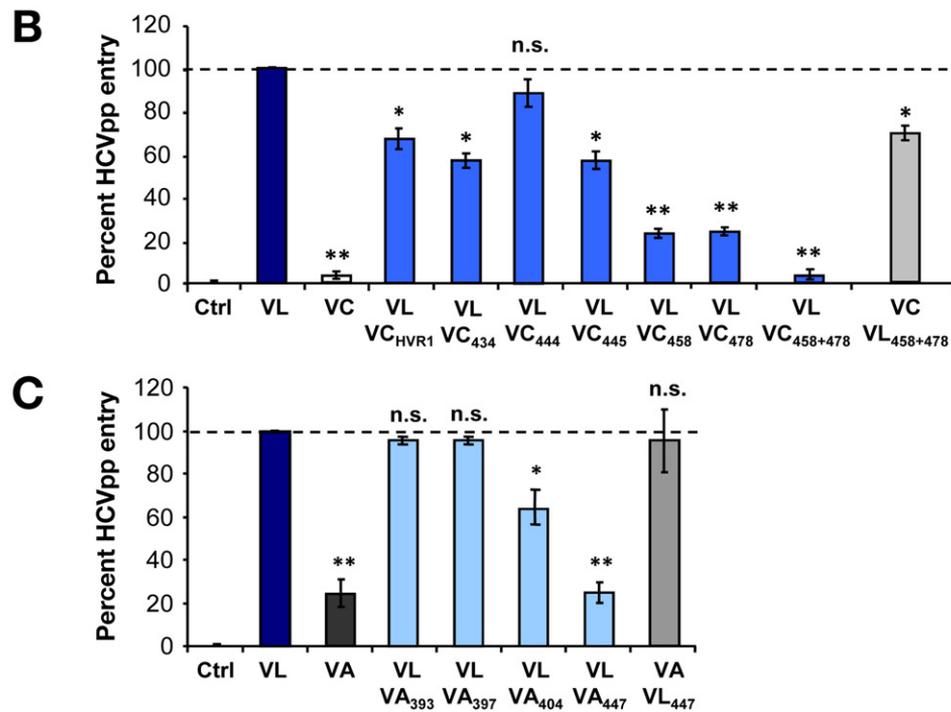


Figure 1. Positions 447, 458, and 478 confer enhanced viral entry of a high-infectivity variant reinfected the liver graft. (A) Genomic organization and mutations of envelope glycoproteins of escape variant VL and nonselected variants VC and VA. HVR1 and HVR2 are depicted in green; E2 domains are depicted in red (DI), yellow (DII), and blue (DIII); and CD81 binding domains are depicted in dark blue.^{29,33,39} Positions 447, 458, and 478 are highlighted in black vertical lines. Differences between VL, VC, and VA in region E1E2₃₈₄₋₄₈₃ are displayed. (B and C) Viral entry in Huh7.5.1 cells of the escape variant VL, the nonselected variants VC and VA, as well as chimeric variants of VC and VA in VL or vice versa (Supplementary Figure 1). HCVpp infection was analyzed by luciferase reporter gene expression. Results are expressed as the percentage of viral entry compared with VL. Means ± standard deviation from at least 4 independent experiments performed in triplicate are shown. Significant differences in HCVpp entry between variants are indicated (**P* ≤ .05; ***P* < .001). aa, amino acid; BD, binding domain.



Overexpression of CD81 significantly enhanced viral entry of VL (3.2-fold) and VC (2-fold) compared with parental cells (*P* < .001) (Figure 2C). The fold-change in HCVpp entry was significantly higher for VL than for VC (*P* < .001). Exchanging the 2 residues at positions 458 and 478 similarly increased viral entry. This suggests that the combination of the 2 individual mutations modulates viral entry by altering CD81 dependency. Overexpression of SR-BI also increased viral entry of VL and VC, but no specific increase was observed for the chimeric strains containing substitutions at positions 458 and 478 (Figure 2C). These data confirm an important role for SR-BI as an entry factor for patient-derived variants, but also show that positions 458 and 478 do not significantly alter SR-BI dependency. Thus, increased entry efficiency of VL in SR-BI-overexpressing cells most likely is caused by other mutations (eg, in hypervariable region 1 [HVR1]).

Viral entry enhancement was less pronounced in cells overexpressing CLDN1 or OCLN than CD81 and SR-BI (Figure 2C), and no specific modulation of viral entry was associated with the 2 variants or chimeric strains.

The CD81 use of viral variants VL, VC, and VA was investigated further using Huh7.5 cells with silenced CD81 expression (Figure 3A).¹⁹ The escape variant VL showed the highest decrease (5.4-fold) of viral entry in shCD81-Huh7.5 cells compared with the decrease of variants VC (4.3-fold; *P* < .001) and VA (2.9-fold; *P* < .001) (Figure 3B and C). Exchange of the mapped residues into chimeric expression plasmids conferred the phenotype of decreased entry of VL (Figure 3B and C), confirming that identified residues modulate viral entry by different CD81 use. Moreover, using a relevant model system for HCV-CD81 interactions occurring in vivo consisting of cell surface-expressed CD81, we show that E1E2 complexes of

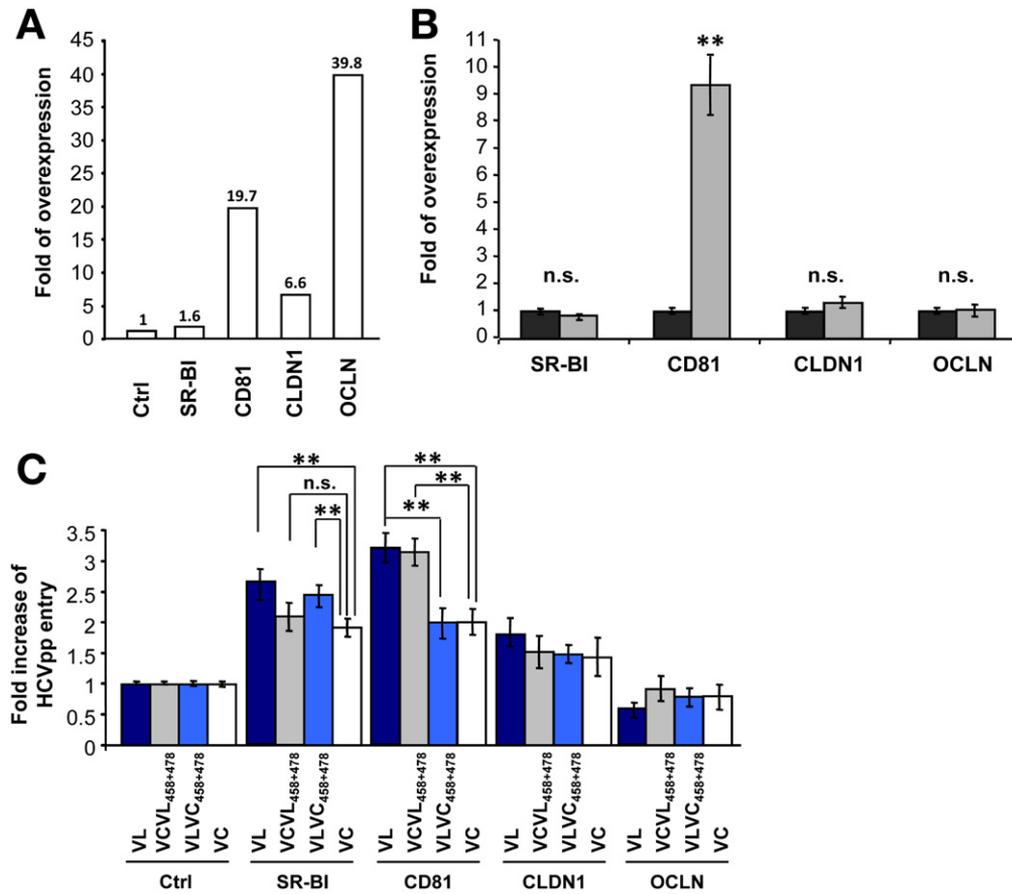


Figure 2. Altered use of CD81 is responsible for enhanced viral entry of the escape variant. (A) Entry factor expression in clones of SR-BI-, CD81-, CLDN1-, or OCLN-transduced Huh7.5.1 cells. The relative overexpression of each entry factor was determined by flow cytometry and is indicated as fold expression compared with parental Huh7.5.1 cells. (B) Entry factor expression in pools of CD81-overexpressing Huh7.5.1 cells (grey bars). The relative entry factor expression was determined as described in panel A. (C) Receptor dependency of patient-derived HCVpp entry. Parental and transduced Huh7.5.1 cells were incubated with parental or chimeric HCVpp and viral entry was determined as described in Figure 1. Viral entry is expressed as the fold-change of viral entry compared with parental cells. Means \pm standard deviation from 3 independent experiments performed in triplicate are shown. Significant differences in HCVpp entry between variants are indicated (** $P < .001$).

the escape variant VL bound less efficiently to shCD81-Huh7.5 cells than glycoproteins of variants VC and VA (Supplementary Figure 2A). Exchange of the mapped residues conferred similar phenotypes as the parental glycoproteins (Supplementary Figure 2B), suggesting that the residues at positions 447, 458, and 478 alter E1E2 interactions with cell surface CD81.

Taken together, these data show the following: (1) the escape variant is characterized by markedly altered CD81 use, and (2) altered CD81 use of the variant is mediated by residues at positions 447, 458, and 478.

Because the levels of E1E2 incorporation into HCVpp and lentiviral p24 antigen expression were similar for all strains (Supplementary Figure 3A–D), it is unlikely that the differences in viral entry are the result of impaired HCVpp assembly or release.

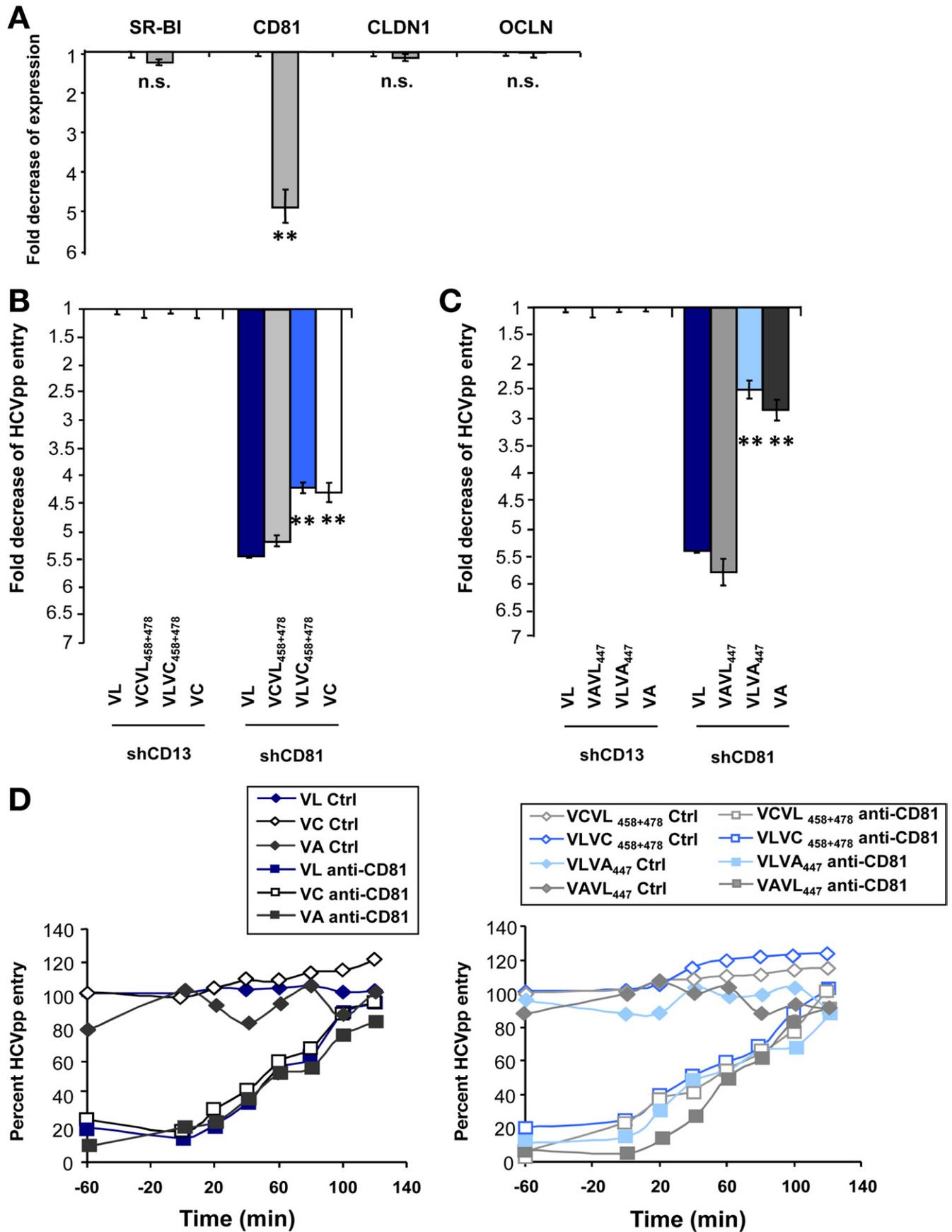
Next, to assess whether enhanced entry is owing to more rapid internalization of viral particles, we investigated internal-

ization kinetics of the parental and chimeric variants in the presence of anti-CD81 antibody.^{16,21,23,24} Because entry kinetics of parental and chimeric variants were similar (Figure 3D), it is unlikely that the mutant-induced modulation of CD81 dependency alters the velocity of viral entry.

Positions 447, 458, and 478 Mediate Escape From Autologous Transplant Serum During Graft Reinfection

To assess whether the residues in region E2_{425–483} influencing viral entry (Figure 1) also were responsible for escape from antibody-mediated neutralization, we studied the impact of each single and combined substitution of the nonselected variant VC on neutralization by autologous pretransplant serum. Autologous pretransplant serum only poorly neutralized the selected variant VL as well as the variants substituted at positions 434, 444, and 445, whereas individual substitution at positions 458 and 478 signifi-

Figure 3. Different CD81 use of viral variants in Huh7.5 cells with silenced CD81 expression. (A) Entry factor expression in Huh7.5 cells with silenced CD81 (grey bars) or CD13 (black bars) expression. CD81 expression was determined by flow cytometry and is indicated as fold expression compared with control shCD13-Huh7.5 cells. (B and C) Entry of patient-derived HCVpp VL, VC, and VA. Huh7.5 cells with silenced CD81 or CD13 expression were incubated with parental or chimeric HCVpp and viral entry was determined as described in Figure 1. Viral entry is expressed as the fold-change of viral entry compared with shCD13-Huh7.5 control cells. Means \pm standard deviation from 3 independent experiments performed in triplicate are shown. Significant differences in HCVpp entry between wild-type and chimeric variants are indicated (** $P < .001$). (D) Entry kinetics of patient-derived variants. Kinetics of HCVpp entry was performed using anti-CD81 or isotype control antibody (5 μ g/mL). HCV entry was determined as described in Figure 1. One representative experiment of 4 is shown.



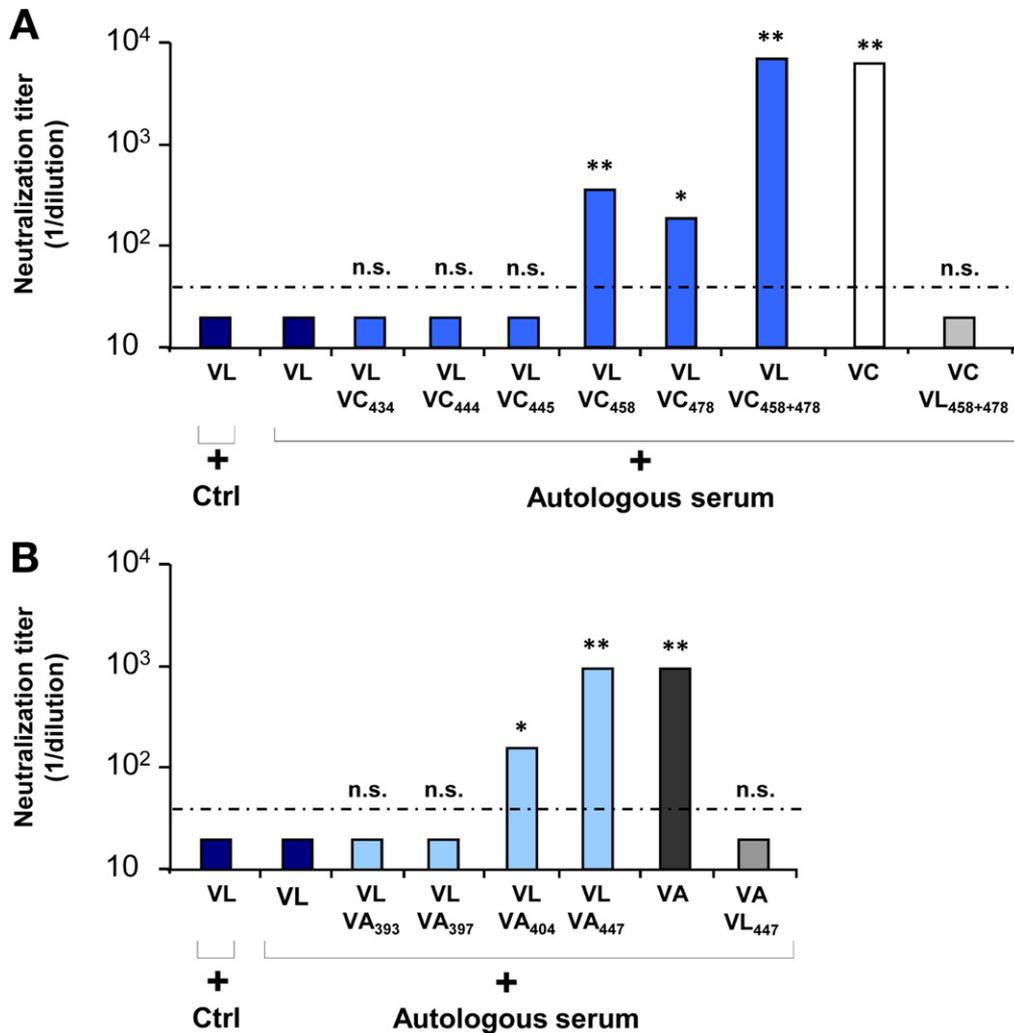


Figure 4. Positions 447, 458, and 478 mediate viral escape from neutralization by autologous transplant serum. Neutralization of the escape variant VL, variants VC and VA, and the chimeric strains. HCVpp were incubated with autologous anti-HCV-positive or control serum in serial dilutions for 1 hour at 37°C before incubation with Huh7.5.1 cells. Neutralization titers obtained by end point dilution are indicated. Dotted line indicates the threshold for a positive neutralization titer (1/40). Means \pm standard deviation from at least 4 experiments performed in triplicate are shown. (A) Neutralization of variants VL, VL containing individual or combined mutations of VC, and VC with double substitutions of VL by autologous anti-HCV-positive pretransplant serum. (B) Neutralization of variants VL, VL containing individual mutations of VA, and VA with single substitution of VL by autologous anti-HCV-positive pretransplant serum. Significant differences in neutralization between variants are indicated (* $P \leq .05$; ** $P < .001$).

cantly ($P < .001$ and $P \leq .05$, respectively) increased the sensitivity of VL_{VC458} and VL_{VC478} to autologous neutralizing antibodies (1:400 and 1:200, respectively) (Figure 4A). It is noteworthy that only the variant VL_{VC458+478} showed a similar neutralization titer as the nonselected variant VC (1:6400; $P < .001$). To confirm that these mutations were indeed responsible for the phenotype of the parental variant VL, we investigated neutralization of VCVL₄₅₈₊₄₇₈ by autologous serum. The variant VCVL₄₅₈₊₄₇₈ escaped autologous neutralization similarly to the escape variant VL (Figure 4A). A similar phenotype was observed when mutation 447 of VA was introduced into the VL complementary DNA (Figure 4B). In contrast, the introduction of other residues into VL only had a minor effect on neutralization (Figure 4B). Taken together, these findings suggest that the residues at positions 447, 458, and 478 simultaneously are responsible for both enhanced viral entry and evasion from antibody-mediated neutralization.

Positions 447, 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 neu-

tralizing antibodies, we investigated whether the identified mutations F447L, S458G, and R478C confer resistance or sensitivity to a panel of mAbs directed against conformational^{9,17} and linear E2 epitopes.¹⁶ The conformational HMABs (CBH-2, CBH-5, CBH-23, and HC-1) have shown a broad cross-neutralizing activity by interfering with E2-CD81 interaction^{9,17} and their epitopes only partially are defined (Supplementary Table 1). AP33 is directed against a conserved epitope comprising amino acids 412–423.²⁵ Although the escape variant VL was neutralized poorly by several HMABs directed against conformational epitopes, VC and VA were neutralized efficiently by all HMABs (Figure 5A and B). Moreover, by substituting the residues at positions 458 and 478 or 447, the well-neutralized nonselected variants VC (VCVL₄₅₈₊₄₇₈) and VA (VAVL₄₄₇) became neutralization resistant as the escape variant VL. Introducing the residues of VC or VA into VL (VL_{VC458+478} and VL_{VA447}) restored neutralization by HMABs, suggesting that these residues are part of the HMABs epitopes. In contrast, anti-E2 antibodies (AP33, 16A6, IGH461) targeting linear epitopes similarly neutralized parental and chimeric variants (Figure 5A and B and Supplementary Table 1).

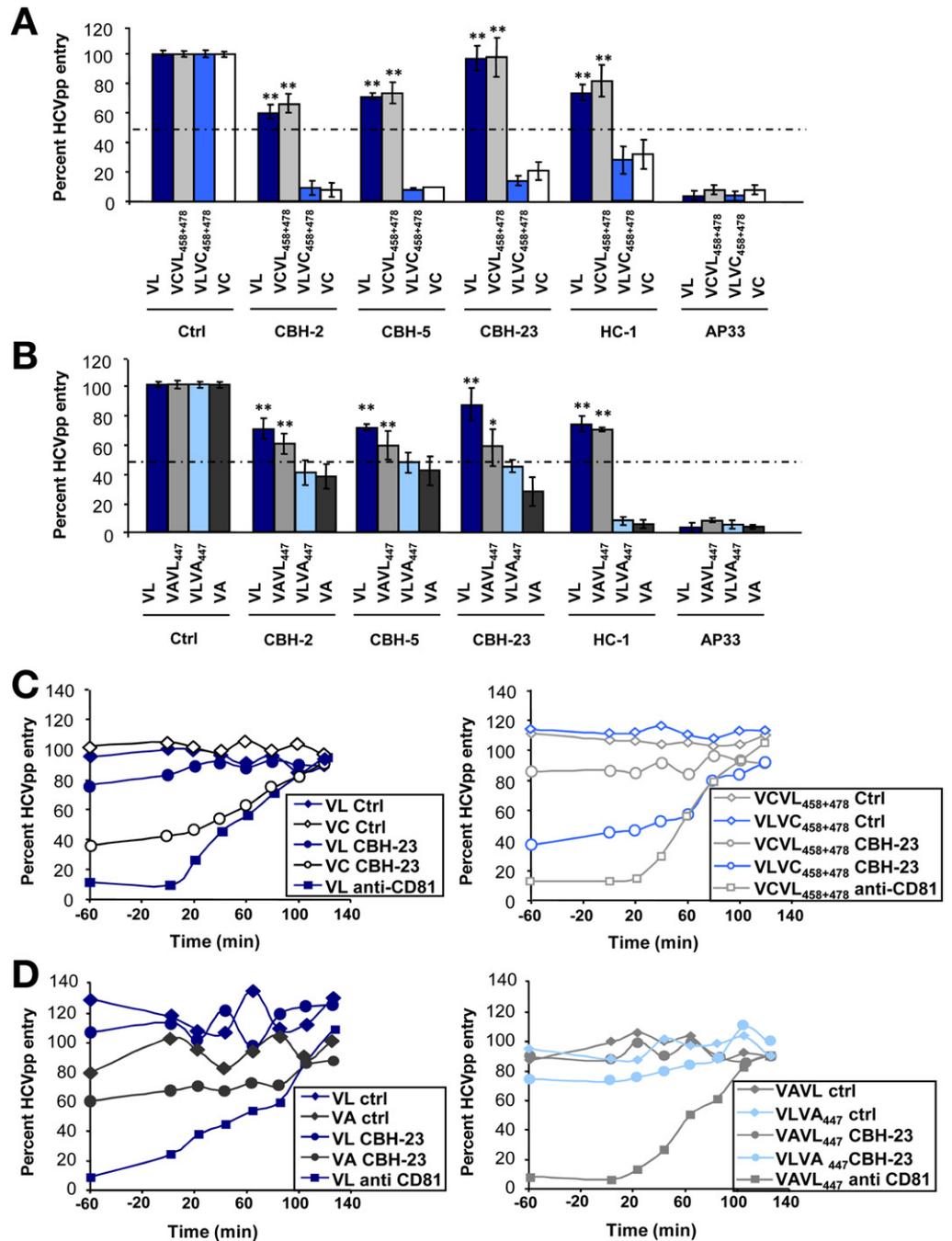


Figure 5. Mechanisms of viral evasion from neutralizing antibodies. (A and B) Escape from neutralization by HMABs directed against conformational and linear epitopes. HCVpp produced from isolates shown in Figure 1 were incubated with HMABs (Supplementary Table 1) or control Ab (10 μ g/mL) for 1 hour at 37°C before incubation with Huh7.5.1 cells. Results are expressed as the percentage of viral entry relative to HCVpp incubated with control mAb. Means \pm standard deviation from at least 4 experiments performed in triplicate are shown. Significant differences in HCVpp entry between variants are indicated (** $P < .001$). (C and D) Escape from neutralization of anti-E2 antibody CBH-23 in kinetic assays. Kinetics were performed as described in Figure 3 (HMAB, 10 μ g/mL; JS-81, 5 μ g/mL). One representative experiment of 4 is shown.

Antibody-mediated neutralization occurs at binding and postbinding steps during viral entry.¹⁶ To map the entry step involved in viral evasion from neutralizing antibodies by VL, we investigated the neutralization kinetics of parental and chimeric variants.^{16,21,23} The anti-E2 HMAb CBH-23 inhibited viral entry of VC and VLVC₄₅₈₊₄₇₈ at postbinding steps during time points closely related to HCV-CD81 interaction (Figure 5C). Partial inhibition at postbinding steps by CBH-23 also was observed for VA and VLVA₄₄₇ (Figure 5D). The VL variant escaped antibody-mediated neutralization at the same steps.

Interestingly, purified HCVpp expressing envelope glycoproteins of the escape variant bound similarly to

neutralizing anti-E2 antibody CBH-23 as the envelope glycoproteins of nonselected variants or variants containing mutations of the identified escape residue (Supplementary Figure 4). Thus, it is likely that viral evasion is not caused by decreased antibody binding to circulating virions but rather occurs during postbinding steps of viral entry in which E2-host entry factor interactions result in conformational changes of the envelope and failure of antibodies to inhibit entry. Taken together, these data indicate that positions 447, 458, and 478 mediate viral evasion from neutralizing antibodies at postbinding steps and time points closely related to HCV-CD81 interaction.

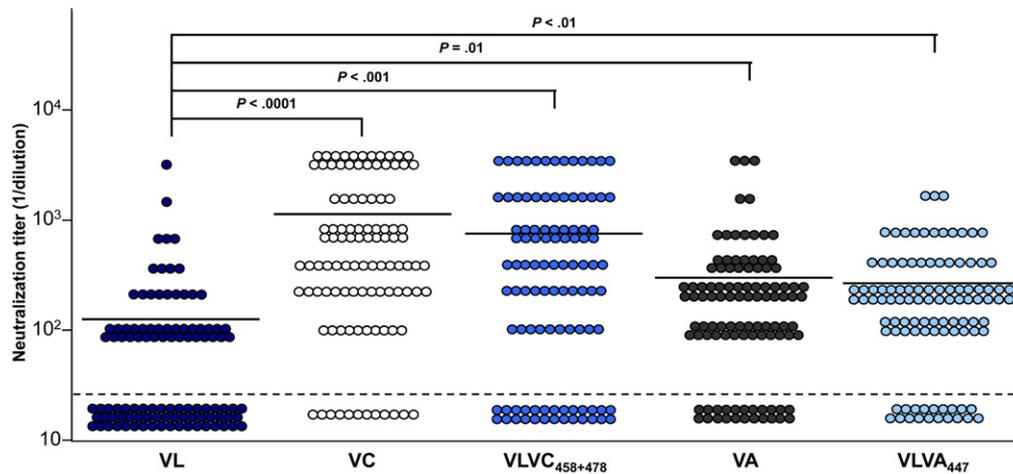


Figure 6. The HCV VL strain is poorly neutralized by antibodies present in sera from a large panel of nonrelated patients with chronic HCV infection. Parental HCVpp (VL, VC, and VA) and chimeric HCVpp (VLVC₄₅₈₊₄₇₈ and VLVA₄₄₇) strains, adjusted for p24 antigen expression, were preincubated for 1 hour with serial dilutions of anti-HCV-positive sera from randomly selected patients with chronic hepatitis C before incubation with Huh7.5.1 target cells. Patient number, sex, HCV genotype, and viral load are indicated in Supplementary Tables 2 and 3. Neutralization was determined as in Figure 4. Mean neutralization titers are marked by lines. Means from at least 3 independent experiments performed in triplicate are shown. Significant differences in neutralization are indicated.

Positions 447, 458, and 478 Mediate Escape From Antiviral Antibodies in Nonrelated Patients With Chronic HCV Infection

To investigate whether these mutations result not only in escape from antibodies from the same patient but also confer resistance to antiviral antibodies of nonrelated HCV-infected patients, we studied the neutralization of the parental variants by a large panel of sera randomly selected from chronically infected patients ($n = 102$). While VL was not neutralized by 53 of 102 patient sera (mean neutralizing titer, 1:144), VC was neutralized significantly by 90 of 102 patient sera (mean neutralizing titer, 1:1088; $P < .001$) (Figure 6 and Supplementary Tables 2 and 3). Similar results were obtained for VA (neutralization by 80 of 102 patient sera; mean neutralizing titer, 1:322; $P = .01$). Functional analysis of HCVpp expressing chimeric envelope glycoproteins showed that neutralization of VC and VA was mediated predominantly by the identified mutations in residues 447, 458, and 478 (Figure 6).

Confirmation of Differential Cell Entry Factor Use and Viral Evasion Using Chimeric HCVcc

Finally, we confirmed the functional impact of the 3 residues on virus–host interactions using the HCVcc system. To address this issue we constructed chimeric JFH-1-based HCVcc expressing the VL wild-type envelope or VL-containing VC- and VA-specific functional residues. Viruses containing patient-derived envelopes showed similar levels of replication and envelope production (data not shown). Phenotypic analyses of infection and neutralization of chimeric HCVcc confirmed the relevance of the identified residues for enhanced entry, differential CD81 use, and viral evasion (Figure 7). While the escape variant VL was poorly neutralized, the identified mutations at positions 447, 458, and 478 restored its sensitivity to

conformational HMAb CBH-23 (Figure 7C) as well as to heterologous sera from chronically infected patients (Figure 7D). These data confirm the functional relevance of the obtained results in the HCVcc system expressing authentic patient-derived envelopes.

Discussion

By using acute infection of the liver graft as an *in vivo* model, we identified a novel clinically and therapeutically important mechanism of viral evasion, where coevolution simultaneously occurs between cellular entry factor use and escape from neutralization.

Several host selection forces operate concomitantly during HCV infection. These include proviral host factors resulting in selection of most infectious viruses best adapted to host factors and antiviral host immune responses leading to escape from immune responses. Antibody-mediated selective pressure is thought to be an important driver of viral evolution.^{8,11} The immune response may fail to resolve HCV infection because neutralizing antibody-mediated response lags behind the rapidly and continuously evolving HCV glycoprotein sequences.¹¹ However, continuous generation of escape mutations during chronic HCV infection also may compromise virus infectivity: indeed, it has been reported that structural changes in E2 leading to complete escape from neutralizing antibodies simultaneously compromised viral fitness by reducing CD81 binding.⁹ Moreover, escape from T-cell responses has been associated with impaired viral replication.^{26,27} We show that clinically occurring mutations simultaneously lead to enhanced viral infectivity by optimizing host factor use and escape from host immune responses. Because this mechanism was uncovered in patient strains isolated during acute liver graft infection it is likely that the novel and unique mecha-

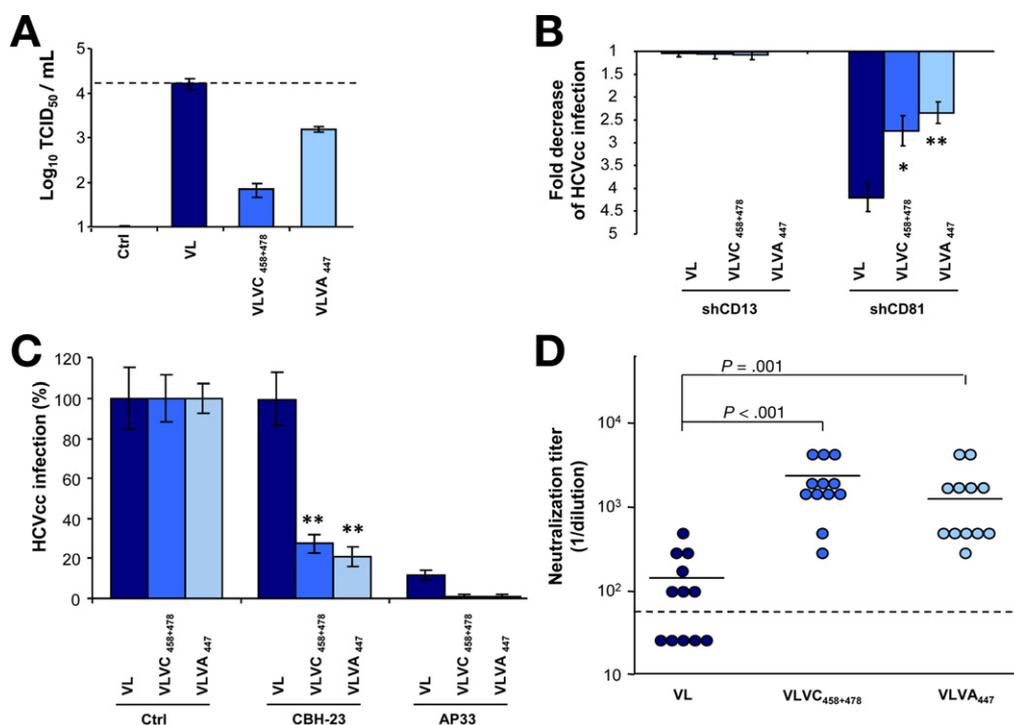


Figure 7. Viral entry and escape from neutralization of chimeric HCVcc expressing patient-derived viral envelopes. (A) Infectivity of HCVcc expressing envelopes of variant VL and functional residues of VA and VC is indicated by TCID₅₀. Means \pm standard deviation from 1 representative experiment are shown. (B) Relative infectivity of chimeric HCVcc expressing patient-derived viral envelopes in Huh7.5 cells with silenced CD81 or CD13 expression. Means \pm standard deviation from 3 independent experiments performed in triplicate are shown. (C) Escape from neutralization by HMAb CBH-23. Neutralization was performed as described in Figure 5. Results are expressed as the percentage of viral infectivity relative to HCVcc incubated with control mAb. Means \pm standard deviation (SD) from at least 3 experiments performed in triplicate are shown. (D) Inhibition of HCVcc infection by anti-HCV-positive sera described in Supplementary Table 3. Neutralization was performed as described in Figure 6. Means from 1 representative experiment performed in triplicate are shown. Significant differences in HCVcc infection between wild-type and chimeric variants are indicated (* $P \leq .05$; ** $P < .001$).

nism of co-evolution between host factor use and viral evasion ensures optimal initiation, dissemination, and maintenance of viral infection in the early phase of liver graft infection. In addition, because the VL strain escapes autologous antibodies from the transplant patient (Fig. 4) and resists monoclonal and polyclonal antibodies of heterologous patients (Figures 5, 6, and 7, and Supplementary Tables 1 and 2), and given the high prevalence of the identified mutations in a large genomic database of viral isolates (Supplementary Figure 5 and Supplementary Results section), the co-evolution of receptor use and escape from neutralizing antibodies also may play an important role for viral evasion in chronic HCV infection in general.

Our mechanistic studies show that the identified viral evasion factors are part of a conformational neutralizing epitope modulating E2-CD81 interactions at postbinding entry steps.^{28,29} It is noteworthy that the same mutations also were responsible for immune escape of VL. Neutralization studies using HMABs directed against discontinuous envelope glycoprotein regions termed *domain B* and *domain C*^{30,31} show that the 3 positions are part of an epitope that plays a key role for neutralization and viral evasion. Because the mutations are outside the known contact residues within the epitopes of the HMABs

CBH-2, CBH-5, CBH-23, and HC-1^{9,17} (Supplementary Table 1), and complementary to previously identified regions associated with escape from neutralizing monoclonal antibodies,²⁵ positions 447, 458, and 478 either modulate the interaction of the majority of antibodies directed against domain B and C epitopes or are part of a novel E2 epitope mediating evasion from host neutralizing antibodies.

Based on previous functional observations and structural predictions, Krey et al²⁹ proposed a model for a potential tertiary organization of E2. In this model, E2 comprises 3 subdomains with the CD81 binding regions located within domain I (W420, A440LFY, Y527, W529, G530, and D535) and potential CD81 binding sites overlapping with domain III (Y613RLWHY).^{28,29,32,33} In this model, positions 447, 458, and 478 are located outside but in close proximity of the previously suggested CD81 binding domains. Moreover, position 447 is located immediately downstream of a conserved motif between HVR1 and HVR2, which has been shown to play an important role in CD81 recognition as well as pre- or post-CD81-dependent stages of viral entry.³² Position 478 is located within HVR2, which modulates, by a complex interplay with HVR1, binding of E2 glycoprotein to CD81.³⁴

Because mutations F447L, S458G, and R478C (1) modulate CD81 dependency of HCV entry (Figures 2 and 3), (2) alter the interaction with cell surface CD81 (Supplementary 2), (3) mediate viral evasion from antibodies at postbinding steps closely related to HCV-CD81 interactions (Figure 5), and (4) are located within E2 loops of the predicted E2 secondary structure and tertiary organization,²⁹ positions 447, 458, and 478 may be part of 2 loops belonging to a larger cluster of closely related surface-exposed E2 loops. These loops most likely are involved in E2-CD81 binding either directly or indirectly as a key point for structural rearrangement during viral entry.^{34,35}

The polar S and R residues present in the escape variant can form nonbonded interactions with other residues by hydrogen bonds and salt bridge, respectively. These interactions could increase the stability of the interacting E2-CD81 interface, allowing efficient entry of the VL escape variant through E2-CD81-CLDN1 co-receptor complexes, which are key determinants for viral entry.^{13,23,36} 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 may promote the surface exposure of the loops. This change could modulate E2-CD81 interactions further and impair the binding of neutralizing antibodies by blocking access to their target epitopes. The F to L substitution present in the VA strain most likely does not profoundly alter the tertiary or quaternary structure of E2. This is suggested by the fact that this position is located in a loop as predicted by the proposed E2 model.²⁹ Thus, it is conceivable that this mutation, which increases E2 hydrophobicity, may reduce accessibility of the loop and its interactions with CD81 or CD81-CLDN1 co-receptor complexes. Alternatively, allosteric mechanisms may play a role in the observed virus-antibody-host interactions.

Taken together, our data identified key determinants of immune evasion in vivo. Mutations conferring neutralization escape altered CD81 receptor use and enhanced cell entry. Moreover, our data suggest that mutations in HVR1, which may modulate entry and neutralization by altering SR-BI dependency (Figures 1, 2, and 4, and data not shown), may contribute to the high entry and escape phenotype of the escape variant. Furthermore, interfering non-neutralizing antibodies may constitute another mechanism of escape (data not shown).

Although proof-of-concept studies in animal models have shown a potential role for HMABs in prevention of HCV infection,^{37,38} the partial or complete escape of the VL variant from autologous and heterologous serum-derived antibodies as well as many broadly cross-neutralizing HMABs (Figure 5; Supplementary Table 1) shows the ability of the virus to evade cross-neutralizing anti-envelope mAbs. By identifying viral and host factors mediating immune evasion in the HCV-infected patient, our results may open new perspectives for the development of

broadly cross-neutralizing anti-envelope or antibodies overcoming viral escape.

Supplementary Material

Note: To access the supplementary material accompanying this article, visit the online version of *Gastroenterology* at www.gastrojournal.org, and at doi:<http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro>.

References

- Alter H. Viral hepatitis. *Hepatology* 2006;43:S230–S234.
- Hofmann WP, Zeuzem S. A new standard of care for the treatment of chronic HCV infection. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2011;8:257–264.
- Watt K, Veldt B, Charlton M. A practical guide to the management of HCV infection following liver transplantation. *Am J Transplant* 2009;9:1707–1713.
- Zeisel MB, Cosset FL, Baumert TF. Host neutralizing responses and pathogenesis of hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2008;48:299–307.
- Zeisel MB, Fofana I, Fafi-Kremer S, et al. HCV entry into hepatocytes: mechanism and potential therapeutic implications. *J Hepatol* 2011;54:566–576.
- Lavillette D, Morice Y, Germanidis G, et al. 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* 2005;79:6023–6034.
- Dowd KA, Netski DM, Wang XH, et al. Selection pressure from neutralizing antibodies drives sequence evolution during acute infection with hepatitis C virus. *Gastroenterology* 2009;136:2377–2386.
- Fafi-Kremer S, Fofana I, Soulier E, et al. Enhanced viral entry and escape from antibody-mediated neutralization are key determinants for hepatitis C virus re-infection in liver transplantation. *J Exp Med* 2010;207:2019–2031.
- 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.
- 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.
- 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.
- Osburn WO, Fisher BE, Dowd KA, et al. Spontaneous control of primary hepatitis C virus infection and immunity against persistent reinfection. *Gastroenterology* 2010;138:315–324.
- Lupberger J, Zeisel MB, Xiao F, et al. EGFR and EphA2 are hepatitis C virus host entry factors and targets for antiviral therapy. *Nat Med* 2011;17:589–595.
- Stamatakis Z, Grove J, Balfe P, et al. Hepatitis C virus entry and neutralization. *Clin Liver Dis* 2008;12:693–712.
- Kuiken C, Combet C, Bukh J, et al. A comprehensive system for consistent numbering of HCV sequences, proteins and epitopes. *Hepatology* 2006;44:1355–1361.
- 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.
- Hadlock KG, Lanford RE, Perkins S, et al. Human monoclonal antibodies that inhibit binding of hepatitis C virus E2 protein to CD81 and recognize conserved conformational epitopes. *J Virol* 2000;74:10407–10416.

18. 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* 2009;84:964–975.
19. Koutsoudakis G, Herrmann E, Kallis S, et al. The level of CD81 cell surface expression is a key determinant for productive entry of hepatitis C virus into host cells. *J Virol* 2007;81:588–598.
20. Bartosch B, Dubuisson J, Cosset FL. Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J Exp Med* 2003;197:633–642.
21. Zeisel MB, Koutsoudakis G, Schnober EK, et al. Scavenger receptor BI is a key host factor for hepatitis C virus infection required for an entry step closely linked to CD81. *Hepatology* 2007;46:1722–1731.
22. Fofana I, Krieger SE, Grunert F, et al. Monoclonal anti-claudin 1 antibodies for prevention of hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 2010;139:953–964, 964.e1–4.
23. 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.
24. 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.
25. Owsianka A, Tarr AW, Juttla VS, et al. Monoclonal antibody AP33 defines a broadly neutralizing epitope on the hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein. *J Virol* 2005;79:11095–11104.
26. Dazert E, Neumann-Haefelin C, Bressanelli S, et al. 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* 2009;119:376–386.
27. Uebelhoer L, Han JH, Callendret B, et al. Stable cytotoxic T cell escape mutation in hepatitis C virus is linked to maintenance of viral fitness. *PLoS Pathog* 2008;4:e1000143.
28. Owsianka AM, Timms JM, Tarr AW, et al. Identification of conserved residues in the E2 envelope glycoprotein of the hepatitis C virus that are critical for CD81 binding. *J Virol* 2006;80:8695–8704.
29. Krey T, d'Alayer J, Kikuti CM, et al. The disulfide bonds in glycoprotein E2 of hepatitis C virus reveal the tertiary organization of the molecule. *PLoS Pathog* 2010;6:e1000762.
30. Keck ZY, Op De Beeck A, Hadlock KG, et al. Hepatitis C virus E2 has three immunogenic domains containing conformational epitopes with distinct properties and biological functions. *J Virol* 2004;78:9224–9232.
31. Helle F, Goffard A, Morel V, et al. The neutralizing activity of anti-hepatitis C virus antibodies is modulated by specific glycans on the E2 envelope protein. *J Virol* 2007;81:8101–8111.
32. Drummer HE, Boo I, Maerz AL, et al. 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* 2006;80:7844–7853.
33. Boo I, Tewierek K, Douam F, et al. Distinct roles in folding, CD81 receptor binding and viral entry for conserved histidines of HCV glycoprotein E1 and E2. *Biochem J* 2012;443:85–94.
34. Roccasecca R, Ansuini H, Vitelli A, et al. 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* 2003;77:1856–1867.
35. McCaffrey K, Boo I, Pombourios P, et al. Expression and characterization of a minimal hepatitis C virus glycoprotein E2 core domain that retains CD81 binding. *J Virol* 2007;81:9584–9590.
36. Harris HJ, Davis C, Mullins JG, et al. Claudin association with CD81 defines hepatitis C virus entry. *J Biol Chem* 2010;285:21092–21102.
37. Law M, Maruyama T, Lewis J, et al. Broadly neutralizing antibodies protect against hepatitis C virus quasispecies challenge. *Nat Med* 2008;14:25–27.
38. 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.
39. Rychlowska M, Owsianka AM, Fong SK, et al. Comprehensive linker-scanning mutagenesis of the hepatitis C virus E1 and E2 envelope glycoproteins reveals new structure-function relationships. *J Gen Virol* 2011;92:2249–2261.

Received July 1, 2011. Accepted April 6, 2012.

Reprint requests

Address requests for reprints to: Thomas F. Baumert, MD, Inserm Unit 748, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, 3 Rue Koeberlé, F-67000 Strasbourg, France. e-mail: Thomas.Baumert@unistra.fr; fax: (33) 3-68-85-37-50.

Acknowledgments

The authors thank F. Chisari (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA) for the gift of Huh7.5.1 cells, J. A. McKeating (University of Birmingham, Birmingham, UK), C. Rice (Rockefeller University, New York, NY), C. Schuster (Inserm U748, Strasbourg, France), M. Heim (University of Basel, Basel, Switzerland), F. Wong-Staal (Itherx, San Diego, CA), J. Dubuisson (Inserm U1019, Lille, France), and F. Rey (Institut Pasteur, Paris, France) for helpful discussions. The authors acknowledge the excellent technical assistance of Michèle Bastien-Valle (Inserm U748, Strasbourg, France).

I.F., S.F.-K., and P.C. contributed equally to this article.

Conflicts of interest

This author discloses the following: Thomas Pietschmann is a member of the advisory board of Biotest AG and has received consulting fees. The remaining authors disclose no conflicts.

Funding

This work was supported by Inserm, 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 de Recherches sur le Sida et les Hépatites Virales (2007/306, 2008/354, 2009/183, 2011/132), 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), Canceropôle du Grand-Est (30/03/09), the Finovi Foundation, the Infrastructures en Biologie Santé et Agronomie, the Société Française d'Exportation des Ressources Educatives program of Higher Education Commission of Pakistan, and Public Health Service grants HL079381 and AI081903.

Supplementary Materials and Methods

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.¹ Immunoblots of HCV glycoproteins were performed using anti-E1 11B7 and anti-E2 AP33 mAbs as described.²

Cellular Binding of Envelope Glycoproteins

Envelope glycoprotein-expressing HEK 293T cells were lysed in phosphate-buffered saline by 4 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, shCD81-, or shCD13-Huh7.5 cells (2×10^5 cells per well) were seeded in 96-well plates. After incubation with lysates containing patient-derived E1E2 proteins, Huh7.5.1 target cells were first incubated with mAb AP33 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and then with phycoerythrin-conjugated anti-mouse Ab (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, BD Biosciences). Bound E2 was analyzed by flow cytometry as described.³

Construction of Plasmids for Production of Chimeric HCVcc Expressing Patient-Derived Envelopes

Genotype 1 JFH-based HCVcc chimeras expressing the structural proteins of patient-derived viruses were produced as previously described for Con1/C3-JFH1-V2440L.^{4,5} Briefly, the complementary DNA region encoding for the HCV core to the first transmembrane domain of NS2 (C3 junction site) from variant VL was inserted into pFK-Con1/C3-JFH1-V2440L using fusion polymerase chain reaction with Pfu DNA polymerase (Agilent Technologies, Massy, France) and standard cloning procedures using appropriate restriction sites including BsmI and AvrII. The obtained construct was designated VL/JFH1. The VL/JFH1 encoding sequence was used as a template to insert individual and combined mutations using the QuikChange II XL site-directed mutagenesis kit (Agilent Technologies) as described previously.¹

Galanthus nivalis Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Binding of HMAb CBH-23 to viral envelopes was analyzed using an enzyme-linked immunosorbent assay with HCVpp as a capture antigen as described.⁶ HCVpp expressing the E1E2 glycoproteins of HCV variants or control pseudoparticles with absent HCV envelope glycoprotein expression were partially purified and enriched through ultracentrifugation as described.¹ Purified particles were quantified as described previously.¹ Partially purified HCVpp or control pseudoparticles were captured onto *Galanthus nivalis* (GNA)-coated microtiter plates as described.⁶ Soluble E2 (derived from strain HCV-H77 and

expressed in 293T cells as described previously³) was used as a positive control for antibody binding. Neutralizing human anti-E2 antibody CBH-23 (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ diluted in phosphate-buffered saline) then was added to captured HCVpp or soluble E2 (1 h at room temperature). After washing and removal of nonbound antibody, mAb binding to HCV envelopes was detected using horseradish-peroxidase anti-human IgG (GE Healthcare, Orsay, France) at a concentration of 1/3000 for 1 hour at room temperature, followed by incubation with 1-step Turbo TMB-enzyme-linked immunosorbent assay (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France) for color development. Absorbance was measured at 450 nm using a microplate reader Softmax program (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

Bioinformatics

Multiple sequence alignment of complete E2 proteins was performed using the European HCV databases (<http://euhcvdb.ibcp.fr>).⁷ Two amino acid repertoires were computed with all E2 sequences of provisional/confirmed genotype 1b using the *ComputeRepertoire* tool as part of the *euhcvdb Extract* tool (<http://euhcvdb.ibcp.fr>).

Results

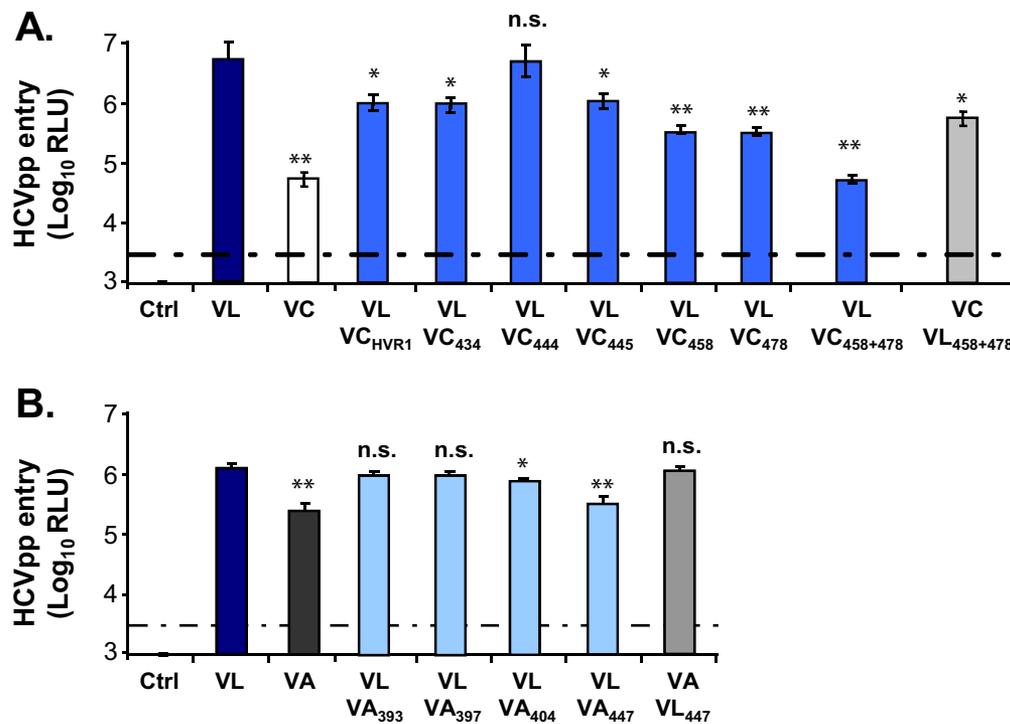
Prevalence of the Identified Mutations in a Large Genomic Database of Viral Isolates

Bioinformatic sequence analysis of a large panel of 2074 HCV strains within the European HCV database further supports the potential relevance of the identified positions for pathogenesis of HCV infection in general.⁷ Residues F, S, and R are observed much more frequently at positions 447, 458, and 478 than L, G, and C. F and S are the most predominant residues at positions 447 and 458 in the large majority of 1b strains, respectively (F447 all, 98.4%; 1b, 96.2%; S458 all, 94%; 1b, 90.3%; Supplementary Figure 5). The position 478 is variable but R (all, 2.4%; 1b, 10.8%) is more frequent than C (all, 0.2%; 1b, 0.9%) (Supplementary Figure 5). The high prevalence of identified residues supports their functional relevance for virus survival and selection because more structurally and functionally relevant residues will be observed more frequently. These data suggest that the epitope containing the identified residues at positions 447, 458, and 478 is responsible not only for viral evasion from autologous antiviral antibodies during LT but also may contribute to viral evasion in chronic HCV infection in general.

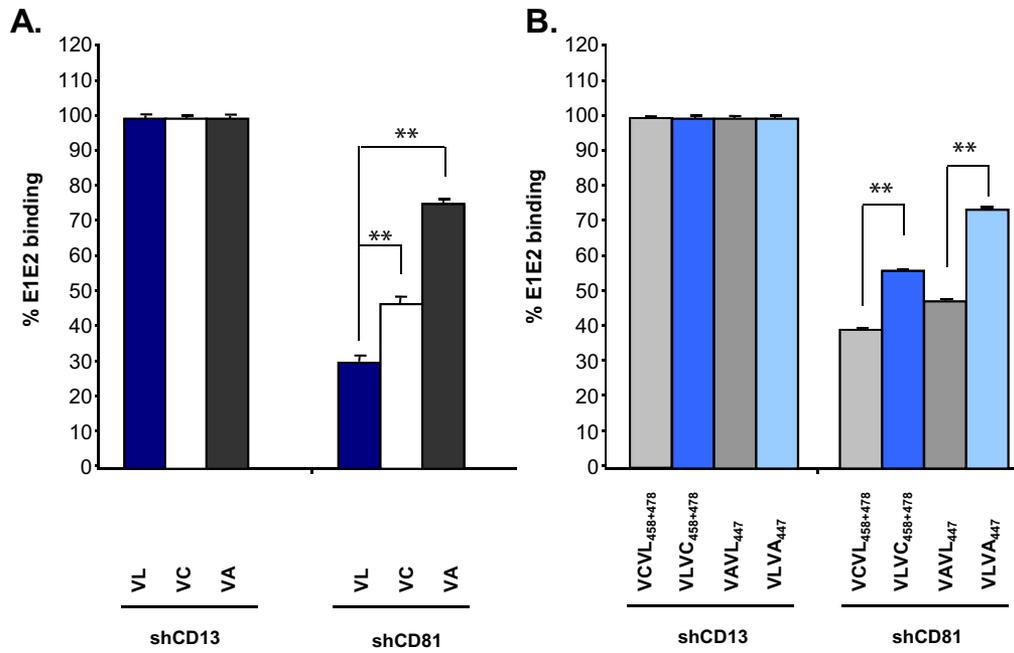
References

1. Fafi-Kremer S, Fofana I, Soulier E, et al. Enhanced viral entry and escape from antibody-mediated neutralization are key determinants for hepatitis C virus re-infection in liver transplantation. *J Exp Med* 2010;207:2019–2031.
2. 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.

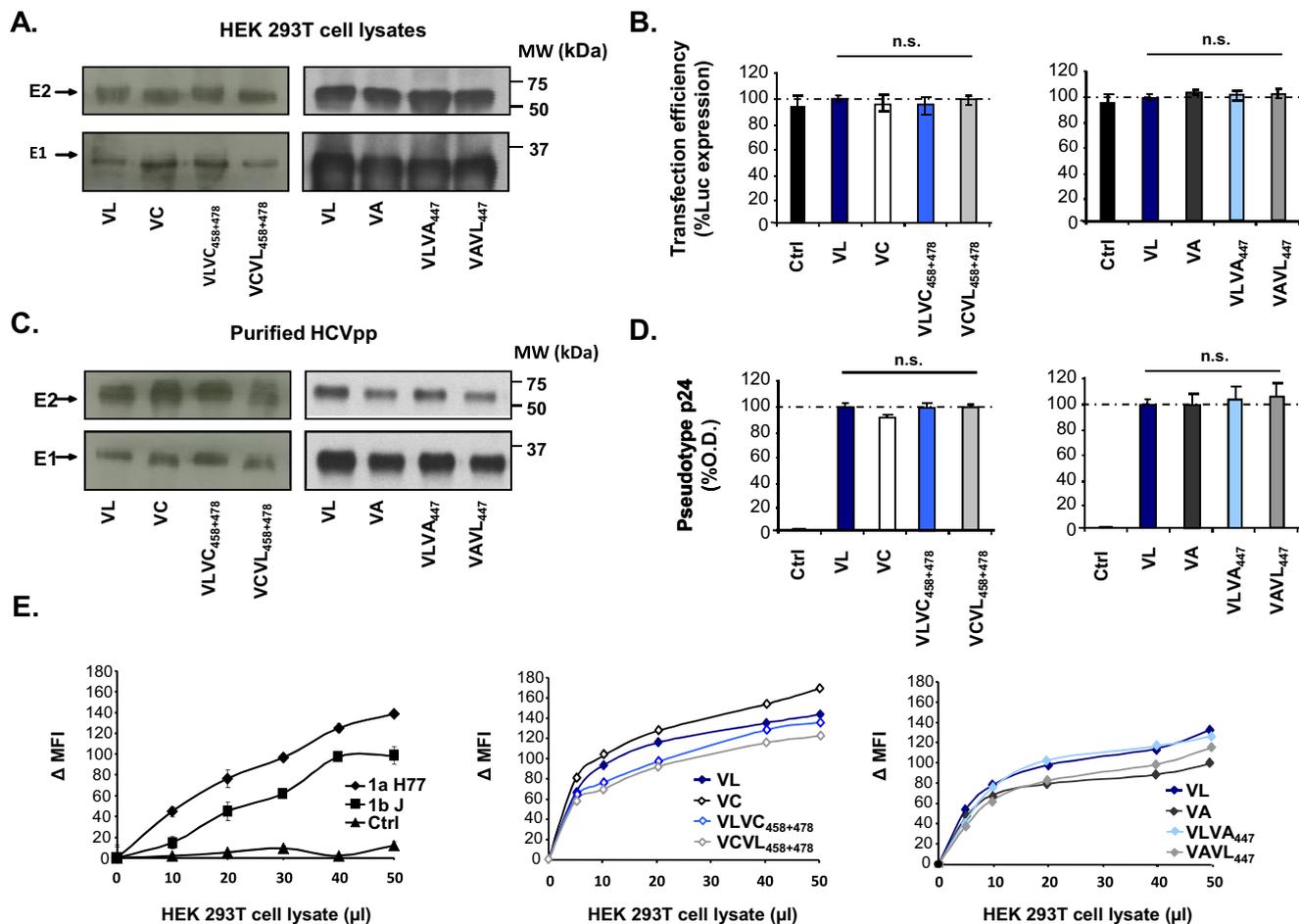
3. Krieger SE, Zeisel MB, Davis C, et al. Inhibition of hepatitis C virus infection by anti-claudin-1 antibodies is mediated by neutralization of E2-CD81-claudin-1 associations. *Hepatology* 2010; 51:1144–1157.
4. Pietschmann T, Kaul A, Koutsoudakis G, et al. Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103: 7408–7413.
5. Kaul A, Woerz I, Meuleman P, et al. Cell culture adaptation of hepatitis C virus and in vivo viability of an adapted variant. *J Virol* 2007;81:13168–13179.
6. Wang Y, Keck ZY, Saha A, et al. Affinity maturation to improve human monoclonal antibody neutralization potency and breadth against hepatitis C virus. *J Biol Chem* 2011;286:44218–44233.
7. Combet C, Garnier N, Charavay C, et al. euHCVdb: the European hepatitis C virus database. *Nucleic Acids Res* 2007;35:D363–D366.
8. Owsianka A, Tarr AW, Juttla VS, et al. Monoclonal antibody AP33 defines a broadly neutralizing epitope on the hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein. *J Virol* 2005;79:11095–11104.
9. Haberstroh A, Schnober EK, Zeisel, 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.
10. Hadlock KG, Lanford RE, Perkins S, et al. Human monoclonal antibodies that inhibit binding of hepatitis C virus E2 protein to CD81 and recognize conserved conformational epitopes. *J Virol* 2000;74:10407–10416.
11. 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.
12. Dimitrova M, Affolter C, Meyer F, et al. Sustained delivery of siRNAs targeting viral infection by cell-degradable multilayered polyelectrolyte films. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:16320–16325.
13. Lupberger J, Zeisel MB, Xiao F, et al. EGFR and EphA2 are hepatitis C virus host entry factors and targets for antiviral therapy. *Nat Med* 2011;17:589–595.
14. Bartosch B, Vitelli A, Granier C, et al. 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* 2003;278: 41624–41630.



Supplementary Figure 1. Actual viral infectivity of HCVpp derived from variants VL, VC, and VA shown as relative light units (RLU) of luciferase reporter gene expression. (A and B) Comparative analysis of viral entry of HCVpp shown in Figure 1. Results are expressed in 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 3×10^3 RLU/assay, corresponding to the mean \pm 3 standard deviations of background levels (ie, luciferase activity of naive noninfected cells or cells infected with pseudotypes without HCV envelopes).^{1,12,13} Background levels of the assay were determined in each experiment. Means \pm standard deviation from at least 4 independent experiments performed in triplicate are shown. Significant differences in HCVpp entry VC, VA, and VL wild-type and mutant variants are indicated (* $P \leq .05$; ** $P < .001$). Ctrl, control; HVR, hypervariable region; V, viral variant.



Supplementary Figure 2. Positions 447, 458, and 478 modulate binding of envelope glycoproteins to CD81 expressed at the cell surface. Binding of native E1E2 complexes expressed from patient-derived complementary DNAs to Huh7.5 cells with silenced CD81 expression (described in Figure 3) was detected by flow cytometry. Results are expressed as the percentage of E1E2 binding compared with shCD13-Huh7.5 control cells. Means \pm standard deviation from 3 independent experiments performed in triplicate are shown. Significant differences in binding between variants are indicated (** $P < .001$).

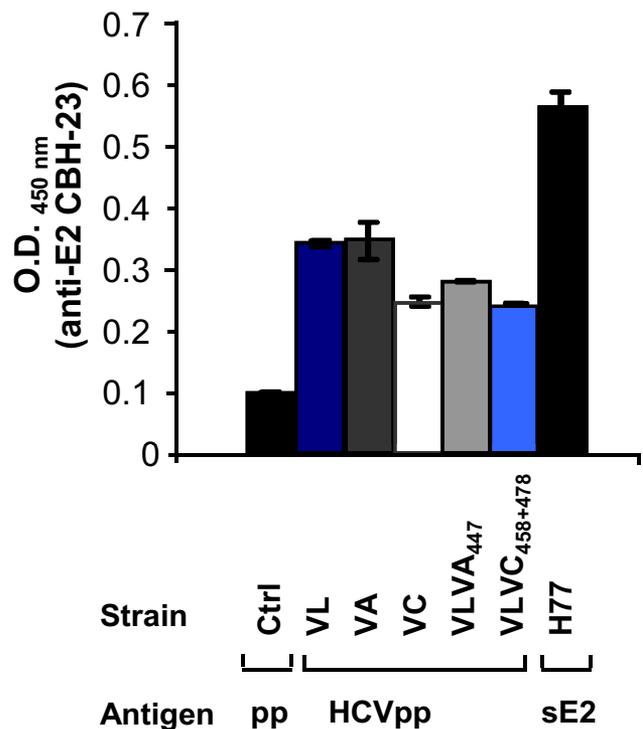


Supplementary Figure 3. Differences in viral entry are not caused by impaired HCVpp production. (A) Analysis of envelope glycoprotein expression. Protein expression was analyzed by immunoblotting as described in the Materials and Methods section. Molecular markers (in kilodaltons) are indicated on the *right*. (B) Transfection efficiency during HCVpp production. Transfection efficiency was analyzed for each variant and quantified by determining luciferase expression in HEK 293T producer cells expressed as a normalized percentage compared with control transfected cells. (C) Envelope glycoprotein expression in HCVpp. HCVpp were purified as described previously^{1,2} and subjected to immunoblot as described in panel A. (D) Lentiviral p24 antigen expression was analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and is indicated as optical density (OD) values at 450 nm. (E) 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 Supplementary Materials and Methods. Results are expressed as delta mean fluorescence intensity (Δ MFI) \pm standard deviation. One representative experiment of 3 is shown. Da, dalton; MW, molecular weight.

Supplementary Table 1. Neutralization of Patient-Derived and Chimeric HCVpp by Monoclonal Anti-Envelope Antibodies

Antibody	Reference	Epitope, amino acid	HCVpp entry, %						
			VL	VC	VCVL ₄₅₈₊₄₇₈	VLVC ₄₅₈₊₄₇₈	VA	VAVL ₄₄₇	VLVA ₄₄₇
AP33	8	412–423	6 ± 3	12 ± 1	3 ± 1	11 ± 5	2 ± 1	5 ± 1	3 ± 1
IGH461	9	436–448	58 ± 4	56 ± 8	51 ± 7	53 ± 3	55 ± 2	56 ± 6	52 ± 7
16A6	9	523–530	76 ± 10	74 ± 8	83 ± 9	82 ± 2	73 ± 9	74 ± 4	81 ± 9
CBH-2	10	Domain B, conformational 431, 523–540	60 ± 5	8 ± 5	65 ± 6	9 ± 5	39 ± 8	61 ± 4	39 ± 10
CBH-5	10	Domain B, conformational 523–540	71 ± 2	10 ± 4	73 ± 7	8 ± 1	36 ± 5	59 ± 7	47 ± 8
CBH-23	Keck and Fong, unpublished data	Domain C, conformational	97 ± 9	21 ± 6	98 ± 13	14 ± 3	32 ± 7	53 ± 12	44 ± 3
HC-1	11	Domain B, conformational 523–540	73 ± 5	31 ± 9	81 ± 10	27 ± 9	2 ± 1	2 ± 1	77 ± 1

NOTE. HCVpp produced from isolates shown in Figure 1 were incubated with mAbs (10 µg/mL) for 1 hour at 37°C. HCVpp-antibody complexes then were added to Huh7.5.1 cells. Viral epitopes targeted by the respective antibody, percentage of HCV entry in the presence of antibody (strains VL, VC, VCVL₄₅₈₊₄₇₈, VLVC₄₅₈₊₄₇₈, VA, VAVL₄₄₇, and VLVA₄₄₇), and source or reference of antibody are shown. Means ± standard deviation from at least 3 experiments, each performed in triplicate, are shown. V, viral variant.



Supplementary Figure 4. Binding of neutralizing anti-E2 HMAb CBH-23 to patient-derived envelope glycoproteins expressed on HCVpp as capture antigens in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). HCVpp expressing envelope glycoproteins of variants VL, VA, VC, VLVA₄₄₇, and VLVC₄₅₈₊₄₇₈ were used as capture antigens on GNA-coated ELISA plates. Control (Ctrl) pseudoparticles with absent HCV envelope glycoprotein expression and recombinant soluble E2 (sE2 derived from strain H77)¹⁴ served as negative and positive controls, respectively. Anti-E2 CBH-23 reactivity was detected as described in the Supplementary Materials and Methods section and is indicated as optical density (OD) values at 450 nm. Means ± standard deviation from 1 representative experiment are shown.

Supplementary Table 2. Characteristics of Patients and Viruses Used for Neutralization Studies

Patient number	Age, y	Sex	Genotype	Viral load, IU/mL	HCVpp neutralization titer, 1/dilution		
					VL	VC	VA
1	65	M	1b	2.29×10^5	100	100	100
2	27	F	1b	9.7×10^4	100	3200	200
3	31	F	1b	1.53×10^5	400	3200	400
4	47	M	3a	1.02×10^6	20	20	100
5	58	M	1b	1.15×10^6	100	3200	200
6	72	M	1b	1.50×10^6	20	200	100
7	51	M	4	4.38×10^6	20	20	20
8	69	F	1b	9.7×10^5	20	400	100
9	36	F	1	1.29×10^5	800	1600	100
10	46	M	1a	1.05×10^6	100	800	100
11	55	M	1a	1.54×10^6	400	3200	200
12	56	M	4c/4d	2.41×10^4	20	800	200
13	56	F	4a	1.09×10^6	100	400	400
14	59	F	1b	3.54×10^5	200	800	200
15	62	M	1a	3.37×10^6	20	20	20
16	50	M	4a	1.48×10^6	20	200	20
17	46	M	4a	4×10^5	20	200	100
18	70	F	1b	1.3×10^6	100	800	20
19	77	F	1b	6.2×10^4	20	100	100
20	61	F	1b	2.58×10^4	200	800	200
21	46	F	1b	2.11×10^5	100	400	800
22	36	M	1a	2.04×10^6	20	200	400
23	52	F	4a	9.12×10^5	20	3200	400
24	54	M	1a	9.77×10^5	100	800	200
25	54	M	1b	1.12×10^6	20	100	200
26	54	F	1a	3.38×10^6	20	400	20
27	47	M	3a	6.16×10^5	100	3200	3200
28	43	M	1a	5.75×10^6	20	800	200
29	51	M	4a	1.44×10^6	100	400	400
30	54	M	2c	4.67×10^5	100	100	3200
31	51	M	1a	6.16×10^6	100	400	100
32	39	M	4a	1.12×10^6	20	200	800
33	62	F	4f	2.88×10^6	20	800	20
34	46	M	4k	3.54×10^5	20	20	100
35	42	M	1a	9.54×10^5	400	800	400
36	54	M	2c	4.67×10^5	200	3200	100
37	34	M	3a	3.23×10^6	20	20	100
38	47	M	3a	7.94×10^4	20	400	20
39	30	F	1b	1.00×10^6	20	200	400
40	47	F	1b	2.29×10^6	100	400	200
41	52	M	1a	1.73×10^6	200	3200	400
42	34	M	1b	1.45×10^6	3200	3200	200
43	46	M	1a	4.34×10^6	200	800	400
44	66	F	1b	3.89×10^5	200	1600	200
45	29	F	1a	1.08×10^5	400	400	200
46	45	M	3a	2.78×10^5	20	200	200
47	65	F	4f	1.46×10^6	20	3200	20
48	55	M	1a	8.81×10^6	20	800	100
49	53	M	1a	1.15×10^6	100	100	100
50	40	M	3a	2.46×10^6	100	3200	200
51	48	F	1a	1.00×10^5	20	800	20
52	37	M	1a	5.08×10^6	20	400	200
53	47	M	3a	6.8×10^6	100	1600	400
54	37	M	1a	1.84×10^6	800	800	200
55	65	F	1b	2.18×10^6	100	100	800
56	45	F	1a	3.93×10^6	1600	1600	400
57	49	M	4a	2.06×10^6	800	3200	200
58	30	M	1b	7.21×10^5	100	800	200
59	31	M	3a	6.66×10^6	100	200	200
60	37	M	1a	6.70×10^6	20	100	100

Supplementary Table 2. Characteristics of Patients and Viruses Used for Neutralization Studies

Patient number	Age, y	Sex	Genotype	Viral load, IU/mL	HCVpp neutralization titer, 1/dilution		
					VL	VC	VA
61	49	M	1a	3.16×10^5	20	800	20
62	43	M	1	6.83×10^5	20	20	20
63	69	M	1b	4.7×10^5	20	20	200
64	48	M	1a	3.28×10^6	20	3200	100
65	46	M	3a	8.55×10^5	20	800	100
66	51	M	1b	1.07×10^6	20	200	1600
67	43	M	1b	4.27×10^5	20	100	800
68	36	M	3a	1.14×10^6	20	800	20
69	53	F	1b	3.06×10^5	20	400	20
70	24	F	3a	1.29×10^6	20	20	20
71	63	M	1b	3.01×10^6	100	200	100
72	44	M	1	1.10×10^5	20	3200	200
73	28	M	3a	1.85×10^6	20	3200	20
74	54	M	1b	1.29×10^5	20	3200	20
75	17	F	1b	2.41×10^5	20	20	200
76	40	M	3a	1.26×10^6	20	20	100
77	35	M	1b	8.89×10^5	20	20	800
78	36	F	6a	1.4×10^7	20	100	400
79	70	F	1b	1.13×10^5	100	100	400
80	62	M	1a	2.68×10^6	100	200	20
81	70	M	1b	2.85×10^5	20	200	3200
82	63	M	1b	1.95×10^5	200	400	400
83	33	M	1a	1.76×10^6	100	200	800
84	35	M	1a	2.78×10^6	20	20	200
85	60	F	1	6.39×10^5	20	200	100
86	57	M	3a	1.22×10^6	200	3200	400
87	60	M	1	3.6×10^6	100	3200	20
88	49	M	4	2.24×10^6	20	1600	20
89	37	M	4	9.35×10^5	100	800	100
90	55	M	1a	3.77×10^6	20	3200	100
91	47	M	1a	2.36×10^6	20	1600	20
92	72	M	3a	3.83×10^5	20	400	20
93	79	M	1b	2.81×10^5	100	1600	100
94	58	F	1b	6.58×10^5	100	3200	200
95	50	M	3a	6.07×10^5	20	3200	100
96	67	F	1b	4.13×10^5	100	800	20
97	49	M	3a	5.22×10^5	200	400	200
98	53	F	1b	2.31×10^6	20	400	1600
99	37	M	1a	1.87×10^5	100	3200	200
100	54	F	4a	9.23×10^5	20	200	100
101	39	M	1a	1.76×10^5	100	800	200
102	51	F	2b	1.10×10^6	100	3200	800

NOTE. HCVpp were incubated with anti-HCV-positive sera from 102 patients with chronic HCV infection (ClinicalTrials.gov identifier NCT00638144). Patient number, age, sex, viral genotype, and load in serum are indicated. HCVpp-antibody complexes were added to Huh7.5.1 cells and infection was analyzed as described in Figure 4. Calculation of neutralization and determination of background and thresholds for neutralization were performed as described in Figure 6. Neutralization titers obtained by end point dilution are indicated for each variant. Means from at least 3 independent experiments, each performed in triplicate, are shown.

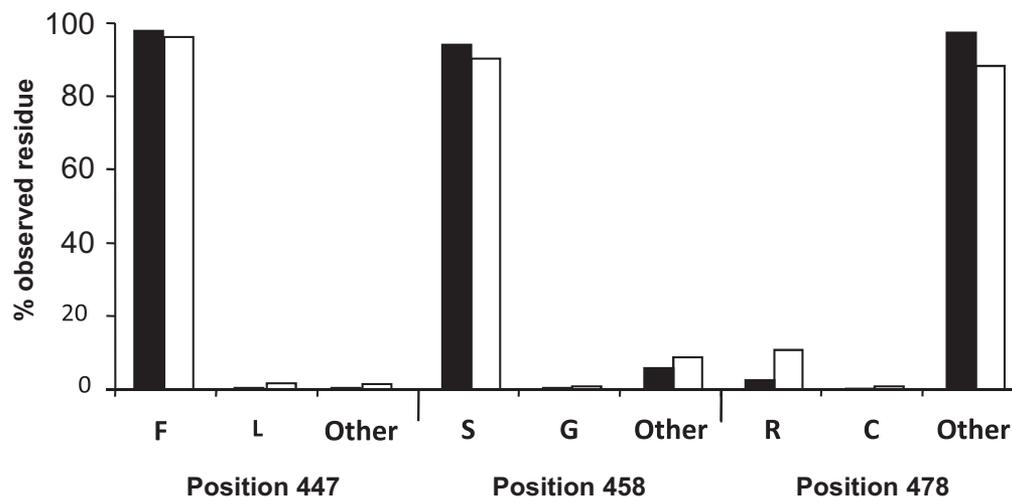
V, viral variant.

Supplementary Table 3. HCVcc Neutralization Titers

Patient number	HCVcc neutralization titer, 1/dilution		
	VL	VLVC ₄₅₈₊₄₇₈	VLVA ₄₄₇
11	400	1600	800
28	20	1600	800
33	20	400	400
35	400	1600	1600
36	200	1600	3200
45	800	1600	800
65	20	1600	1600
66	20	3200	800
68	20	1600	1600
94	100	3200	800
98	100	800	3200
99	100	3200	1600

NOTE. Results were confirmed using chimeric HCVcc expressing the HCV envelope glycoproteins depicted in Figure 7 and using 12 representative sera from patients. Neutralization assays were performed using a similar protocol as described in Supplementary Tables 2 and 3. Means from at least 3 independent experiments, each performed in triplicate, are shown.

V, viral variant.



Supplementary Figure 5. Distribution of residues at positions 447, 458, and 478 of HCV E2 sequences in the European HCV databases. Distribution of residues at positions 447, 458, and 478 for HCV complete E2 sequences from all subtypes (black) and from subtype 1b only (white) within the European Hepatitis C Virus databases⁷ (available: <http://euhcldb.ibcp.fr>). F and S are the predominant residue at positions 447 and 458 (F447, 98.4%; 1b, 96.2%; S458 all, 94%; 1b, 90.3%). The position 478 is variable (it belongs to HVR2) but R (all, 2.4%; 1b, 10.8%) is more frequent than C (all, 0.2%; 1b, 0.9%).

Publication n°2

Apolipoprotein E association with hepatitis C virus particles mediates evasion from host immunity

Felmlee DJ *, **Fauvelle C***, Lefèvre M, Heydmann M, Hiet MS, Bartenschlager R, Fofana I, Habersetzer H, Milne R, Patel AH, Vercauteren K, Meuleman P, Zeisel MB, Schuster C, Fafi-Kremer S#, Baumert TF# (*# contribution équivalente).

PNAS (in submission process)

1 **Apolipoprotein E association with hepatitis C virus particles mediates evasion**
2 **from host immunity**

3
4 Daniel J Felmler^{a,b*}, Catherine Fauvelle^{a,b*}, Mathieu Lefèvre^{a,b}, Laura Heydmann^{a,b},
5 Marie-Sophie Hiet^c, Ralf Bartenschlager^c, Isabel Fofana^{a,b}, François Habersetzer^{a,b,d},
6 Ross Milne^e, Arvind H Patel^f, Koen Vercauteren^g, Philip Meuleman^g, Mirjam B Zeisel^{a,b},
7 Catherine Schuster^{a,b}, Samira Fafi-Kremer^{a,b,h#}, Thomas F Baumert^{a,b,d#}

8
9 ^aInserm, U1110, 67000 Strasbourg, France; ^bUniversité de Strasbourg, 67000
10 Strasbourg, France; ^cDepartment of Infectious Diseases, Molecular Virology, Heidelberg
11 University, 69120 Heidelberg, Germany; ^dPôle Hépat-Digestif, Hôpitaux Universitaires
12 de Strasbourg, 67000 Strasbourg, France ^eDepartment of Pathology and Laboratory
13 Medicine, University of Ottawa Heart Institute, Ottawa, Ontario, K1Y4 4W7 Canada;
14 ^fMRC - University of Glasgow Centre for Virus Research, Glasgow, G11 5JR United
15 Kingdom; ^gCenter for Vaccinology, Ghent University, Ghent University Hospital, 9000
16 Ghent, Belgium; ^hLaboratoire de Virologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg,
17 67000 Strasbourg, France

18 * #: Equal contributors

19 **Classification: BIOLOGICAL SCIENCES:** Microbiology

20 **Word count:** 30,202 characters without figures

21 **Correspondence:** Thomas F. Baumert, M. D. Inserm Unit 1110, Hôpitaux
22 Universitaires de Strasbourg, 3 rue Koeberlé, F-67000 Strasbourg, France; phone: (33)
23 3 68 85 37 02; fax: (33) 3 68 85 37 50, e-mail: Thomas.Baumert@unistra.fr

1 **Keywords:** Hepatitis C virus, apolipoprotein, vaccine, immune evasion

2 **Abbreviations used:**

3 ApoE, apolipoprotein E; DAAs, direct-acting antivirals; HCV, hepatitis C virus; LDL, low-
4 density lipoprotein; nAbs, neutralizing antibodies; TRL, triglyceride-rich lipoprotein.

5

1 **ABSTRACT**

2 The development of hepatitis C virus (HCV) vaccines and immunopreventive
3 approaches has been hindered by viral adaptations that evade host immunity. A
4 hallmark feature of HCV is that virions associate with triglyceride-rich lipoproteins (TRL),
5 which appear to contribute to virus-host interactions during viral entry. In this study, we
6 investigate the role of lipoproteins in viral evasion from B cell responses using acute
7 liver graft infection as a clinical model to demonstrate that HCV utilizes not only TRL,
8 but specifically the host factor apolipoprotein E (apoE) to efficiently escape neutralizing
9 antibodies (nAbs). Using functional studies that modulate host apolipoprotein
10 expression, we identify apoE as a key component mediating immune evasion of HCV
11 lipoviral particles. We further identify a residue within the viral envelope glycoprotein E2
12 that determines apoE-dependency by modulating HCV-apoE interactions. Collectively,
13 our results identify a functional role of host apoE in viral evasion and persistence,
14 suggesting that this mechanism acts as an adaptive factor shaping HCV evolution
15 during infection. These virus-lipoprotein interactions that facilitate viral evasion indicate
16 that critical lipoprotein components should be considered to augment the design of next-
17 generation of HCV vaccine candidates.

18

1 **SIGNIFICANCE STATEMENT**

2 Hepatitis C virus (HCV) infection is a leading cause of liver disease worldwide, in part
3 because the development of an effective vaccine has been elusive. HCV vaccine
4 candidates have failed to overcome the viral adaptations to host immunity that enable
5 HCV to establish chronic infection. This study shows that through interaction with host
6 lipoprotein component apolipoprotein E (apoE), HCV escapes host neutralizing
7 antibodies. Furthermore, a key mutation in a viral envelope glycoprotein determines
8 apoE association, and apoE dependence for infection. Future vaccines may be more
9 effective by finding unique epitopes that integrate both viral and apoE elements to more
10 precisely mimic HCV/lipoprotein hybrid particles.

11

1 INTRODUCTION

2 Hepatitis C virus (HCV) is a major health problem infecting approximately 130 million
3 individuals worldwide. Unlike other viruses of the Flaviviridae family, HCV infection
4 typically results in chronic infection that over time can lead to liver cirrhosis and
5 hepatocellular carcinoma (1). Recently developed direct-acting antivirals (DAAs) have
6 improved the efficacy of treatment, but limitations due to resistance, adverse effects,
7 and access to therapy persist, highlighting the need for an effective vaccine and
8 immunologically based approaches to prevent liver graft infection. A consistent hallmark
9 of vaccines against pathogens has been their reliance on immunogens that elicit
10 neutralizing antibodies (nAbs) (2). HCV vaccine development has been impeded by the
11 viral adaptations to host immunity that enable chronic infection. The host immune
12 system lags behind the continuous evolution and adaptation of HCV, allowing the virus
13 to escape humoral immunity (3, 4). However, the escape mechanisms from nAbs during
14 chronic HCV infection are only partially understood. Clearly, the development of an
15 effective vaccine requires a detailed understanding of viral evasion from host immune
16 responses, including nAbs (5).

17 A hallmark of HCV is its association with triglyceride-rich lipoproteins (TRL) and low-
18 density lipoprotein (LDL), resulting in HCV being highly heterogenous in buoyant density
19 (6-8). The functional impact of this association is relevant for viral attachment and entry
20 (9). Although it has been hypothesized that lipoprotein association may contribute to
21 viral evasion (6), the functional proof has not yet been demonstrated.

22 An *in vivo* scenario that allows the study of viral evasion is the acute infection of the
23 liver graft that occurs after patients with HCV infection undergo liver transplantation. We

1 previously reported that viral entry and escape from host nAbs are key determinants of
2 HCV infection during liver transplantation (10, 11). Using liver graft infection as a clinical
3 model, we aimed to determine the functional role of lipoprotein components in viral
4 evasion. Our findings reveal a highly adapted mechanism of escape defining a novel
5 challenge for the development of vaccines and immunopreventive approaches.

6

7 **RESULTS**

8 To understand the importance of TRL-association in immune evasion, we used the
9 genotype 1b escape variant L (VL) (10). This variant was isolated from a patient during
10 liver transplantation and is characterized by enhanced viral entry and broad escape
11 from patient-derived autologous and heterologous cross-neutralizing antibodies (11).
12 VL:JFH1 is a chimera containing the structural genes of the VL strain (11) and the
13 nonstructural genes of JFH1 allowing study of the mechanisms of viral evasion in a
14 state-of-the-art cell culture model without sufficient time to allow genetic cell culture
15 adaptation (12). Virus association with lipoproteins of different size and lipid composition
16 can be distinguished by their density gradient profile (13). Initial fractionation on
17 isopycnic density gradients revealed that the distribution of infectious particles of
18 VL:JFH1 has a significantly distinct buoyant density profile relative to the intensively
19 studied highly virion assembly-competent J6:JFH1 genotype 2 chimera, Jc1 (Fig. 1A,B).
20 More than 70% of VL:JFH1 distribute to densities lower than the LDL density of 1.05
21 g/ml, while only approximately 30% of Jc1 are low density (Fig. 1B). The profile of
22 VL:JFH1 also differs from the distribution of non-infectious HCV RNA, which
23 predominantly distributes to higher density fractions (Fig. S1A). Since the VL variant is

1 the dominant variant post liver transplantation, exhibiting fitness *in vivo*, this distinct
2 buoyant density profile allowed the study of TRL association in escaping host adaptive
3 immunity (10, 11). After fractionating VL:JFH1 by density, we added heterologous
4 serum from a patient with chronic genotype 1b HCV infection to each fraction, prior to
5 infection of Huh7.5.1 cells. Interestingly, we observed variable neutralization efficacy
6 based on virus particle density, with those of low density (1.03 g/ml, fraction 2) being the
7 most capable of escape (Fig. 1C). Consistent with the hypothesis that lipoproteins
8 mediate escape, this fraction is the most enriched in apolipoproteins apoB, apoAI, and
9 low-density apoE (Fig. S1B). To address if this escape mechanism is also observed
10 using nAbs elicited by HCV infection of a different genotype, we pre-incubated the
11 fractions with patient serum with genotype 3a infection. We confirmed the same pattern
12 of escape using both genotype 1b and 3a sera, definitively indicating the general nature
13 of TRL-association in mediating escape (Fig. 1C). Interestingly, the virus associated
14 with the very lowest density fraction was significantly less capable of escape than the
15 adjacent fraction (Fig. 1C). Our results are concrete data indicating that lipoprotein
16 association is a key strategy for escape from cross-nAbs.

17 To investigate mechanisms by which HCV-TRL associations mediate HCV evasion,
18 we investigated the role of apoE. ApoE has previously been demonstrated to be
19 associated with both HCV and TRL, and is involved in HCV infection (7). Furthermore,
20 apoE adopts different conformations based on the lipoproteins or lipids it binds, and has
21 distinct functions in differing contexts (14). To determine if apoE is specifically involved
22 in escape, cells were simultaneously electroporated with VL:JFH1 RNA and siRNA that
23 knocks down apoE expression, confirmed by immunoblot, or a control oligonucleotide

1 (Fig. 2). Diminishing apoE expression decreased the quantity of infectious particles
2 generated by approximately 2-fold, but the resulting viruses were over 10-fold more
3 sensitive to cross-neutralization (Fig. 2). This data is the first to indicate that apoE is not
4 only important for virus production and infection, but also plays a key role in nAb
5 escape.

6 Cell-to-cell transmission has been proposed as a mechanism to avoid nAbs through
7 propagation of the virus without entering the intravascular compartment (15); (16). To
8 investigate whether apoE association is relevant in cell-to-cell transmission, we used an
9 anti-apoE antibody (1D7) that binds the low-density lipoprotein receptor (LDLr)-binding
10 domain of apoE (17), and compared cell-to-cell transmission of VL:JFH1 and Jc1, since
11 these variants have different TRL association (Fig.1A). Cell-to-cell transmission of Jc1
12 demonstrated an approximately 3-fold higher capacity than that of VL:JFH1 in this
13 assay (Fig. 3A). While the anti-apoE antibody (1D7), did not affect cell-to-cell spread,
14 antibodies recognizing HCV entry factor CD81 (18) dramatically inhibited 70-80% of
15 cell-to-cell transmission of both Jc1 and VL:JFH1 (Fig. 3A,B). We observed the lack of
16 effect of 1D7 in cell-to-cell transmission despite its capacity to highly inhibit extracellular
17 transmission (Fig. 3C). These data indicate that antibody-mediated interference of apoE
18 predominantly plays a role in extracellular transmission. However, we cannot exclude
19 that other apoE epitopes, domains or other apolipoproteins not targeted by anti-apoE
20 1D7 may be involved cell-to-cell transmission.

21 To determine if apoE association is an aspect of quasispecies evolution, we
22 investigated the role of a previously identified residue from a variant that alters nAb
23 sensitivity (11). Our previous studies identified residue 447 as important in the escape

1 phenotype due to altered CD81 usage (11). This residue maps to a putative linking
2 region between domain I and domain II of E2 (Supplementary Figure 2) (19). Indeed, a
3 prominent pre-transplantation variant absent in the post-transplantation infection, variant
4 A (VA), has leucine rather than phenylalanine at position 447, rendering it both sensitive
5 to neutralization and less dependent on CD81 for cell entry (11). Introducing this
6 mutation into VL:JFH1 with 447L revealed To determine if these mutants utilize apoE
7 differently, we tested the modulating effect of the 1D7 anti-apoE antibody in infection.
8 Interestingly, the VL:JFH1 strain was efficiently neutralized by 1D7, while the 447L and
9 447A mutants were at least 3-fold less sensitive to neutralization by this antibody (Fig.
10 4A). In contrast, antibodies 3H1 and 6C5 that bind the N- and C-terminal regions of
11 apoE, respectively (17), did not inhibit HCV infection (data not shown). These data
12 indicate that apoE utilization is more extensive in the VL variant as compared to the 447
13 mutants.

14 To determine if this observation might be due to altered apoE association of the
15 virus particles, we immunoprecipitated HCVcc with either non-specific mouse IgG or
16 with each of the three anti-apoE antibodies 1D7, 3H1, or 6C5. Interestingly, all three
17 apoE recognizing antibodies were at least 2.5-fold more effective at precipitating the
18 VL:JFH1 than the 447 mutants (Fig. 4B), quantitatively indicating a more robust
19 association of the escape variant with apoE. Taken together, our data indicate that
20 apoE utilization for infection is a virus-associated factor that, along with altered host cell
21 receptor usage (11), shapes the evolution of HCV quasispecies for transmission. While
22 previous studies have suggested a role of HVR1 (20), and E2 residue 451 in HCV-TRL

1 interactions (21), our results identify a previously undiscovered E2 determinant that links
2 nAb escape and apoE dependency with apoE association of HCV particles.

3 **DISCUSSION**

4 Collectively, our results identify a new paradigm for viral evasion and persistence.
5 We provide arresting conclusions that TRL and apoE specifically are key mediators of
6 nAb escape, an important consideration since effective vaccine design is based on
7 eliciting nAbs (2). It has long been known that HCV associates with TRL in patient
8 serum and relies on elements of very-low density lipoprotein (VLDL) assembly,
9 including apoE in production of infectious particles (6, 7, 22). Evidence indicates that
10 apoE, along with apoA1 and apoB are part of HCV particles (7, 23). While it has been
11 postulated that this virus-host interaction may play a role in immune evasion (6), only
12 preliminary evidence has been obtained to support this hypothesis (21, 24). Here, by
13 using functional proof-of-concept studies, multiple techniques, and patient-derived HCV
14 strains and antibodies, we define that apoE contributes to viral evasion and thus,
15 persistent infection. More than 90% of circulating apoE is hepatically derived; it stands
16 to reason that HCV has adapted this host factor to conceal its epitopes (25). Similar to a
17 very recently published study that demonstrated that hepatitis A virus uses membrane
18 components to generate an alternate form to evade antibody responses (26), our data
19 indicate that HCV has evolved distinct mechanisms to exploit host cell-derived
20 components to establish persistent infection.

21 The discovery of virus-apoE interactions as a unique mechanism of viral evasion has
22 important implications both for viral pathogenesis and for the development of
23 immunotherapies and vaccines. Indeed, our data give rise to renewed hope by

1 suggesting that the next generation of immunopreventive approaches and vaccine
2 candidates based on identifying novel epitopes that integrate both viral and lipoprotein
3 components and render HCV detectable by the humoral response. While this new
4 approach may prove effective, caution to avoid eliciting self-recognizing antibodies
5 against apoE is necessary.

1 **MATERIALS AND METHODS**

2 ***Patient samples***

3 Serum samples from patients with chronic HCV infection were obtained with informed
4 consent and approval from the Strasbourg University Hospital Institutional Review
5 Board (ClinicalTrial.gov Identifiers NCT00638144 and NCT00213707).

6

7 ***Cells and reagents***

8 Huh7.5.1 and Huh7.5 GFP cells were cultured as described (27). Mouse monoclonal
9 anti-apoE (ab8226) and anti-beta actin (ab1906) for immunoblot were obtained from
10 Abcam. Mouse monoclonal anti-apoE (1D7, 3H1, 6C5), rat monoclonal anti-CD81 (QV-
11 6A8-F2-C4), and mouse monoclonal anti-E2 antibody (AP33) have been described (10,
12 17, 18). Sheep anti-NS5A was provided by M. Harris (28). Human anti-E2 AR3B was
13 provided by M. Law (29).

14

15 ***HCVcc production, infection and neutralization***

16 Plasmids for cell culture derived HCV (HCVcc) production of VL:JFH1 (genotype 1b/2a),
17 Jc1 (2a/2a), JFH1 (2a) have been described (11, 12, 30). HCVcc were produced as
18 described (12) and infectivity was measured by determining the tissue culture infectious
19 dose 50% (TCID₅₀) (31). HCVcc neutralization using patient-derived serum and
20 antibodies was performed as described (11). Silencing of apoE expression and
21 immunoblotting in HCV producer cells were performed as described (22).

22

23 ***Quantification of HCV particle buoyant density distribution***

1 HCVcc virus was concentrated 10-fold using a Vivaspin column (GE Healthcare).
2 Density distributions of infectious HCVcc were determined by overlaying 0.5 ml of
3 culture media on a 5 ml, 4-40% iodixanol step gradient, and ultracentrifuging samples
4 for 16h at 40,000 rpm on a SW-55 rotor (Beckman Coulter). 625 µl fractions were
5 carefully harvested from the top of each tube, and density was determined by weighing
6 0.5 ml of each fraction. Each fraction was assayed for infectivity by TCID₅₀ by detecting
7 NS5A as described (31) or for RNA distribution by qRT-PCR as described (22, 27).

8

9 ***HCV cell-to-cell transmission***

10 HCV cell-to-cell transmission was assessed as described (Lupberger et al., 2011; (32).
11 Producer Huh7.5.1 cells were electroporated with Jc1 RNA or VL:JFH RNA. Medium
12 was changed 4h post-electroporation. 24h post-electroporation, medium was again
13 changed and naïve target Huh7.5-GFP cells were added concomitantly with neutralizing
14 antibody AP33 (10 µg/mL) to block cell-free transmission. For analysis of the role of
15 virus and host cell factors, cells were incubated with 10 µg/ml of either control IgG, anti-
16 CD81 (QV-6A8-F2-C4), or anti-apoE (1D7). 72h post-electroporation, cells were fixed
17 with paraformaldehyde, stained with an anti-E2 (AR3B) antibody and analyzed via flow
18 cytometry.

19

20 ***Immunoprecipitation, RNA extraction and qRT-PCR***

21 HCVcc virus was concentrated 10-fold from cell supernatants using a Vivaspin column
22 (GE Healthcare). Immunoprecipitation was performed using 5 µg of normal mouse IgG
23 (Invitrogen, Saint Aubin, France), anti-E2 (AP33) and anti-apoE (1D7, 3H1, 6C5)

1 antibodies as described (10, 17). After 30 min incubation, 5 µg rabbit anti-mouse was
2 added for an additional 30 min, followed by addition of 20 µl Protein A/G PLUS-agarose
3 beads (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany). HCV RNA was extracted
4 using the RNeasy Qiagen kit (Courtaboeuf, France) and qRT-PCR was performed as
5 described (22, 27).

6

7 **Statistics**

8 Data sets were determined to be by paired *t* test.

9

10 **ACKNOWLEDGEMENTS**

11 The authors thank F. Chisari (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA) for the gift
12 of Huh7.5.1 cells, T. Wakita (Dept. of Virology II, National Institutes of Health, Tokyo,
13 Japan) for providing HCV strain JFH1, Dr. M. Harris (University of Leeds, Leeds, UK) for
14 the gift of the sheep anti-NS5A anti-sera and Dr. M. Law (The Scripps Research
15 Institute, La Jolla, CA) for anti-E2 AR3B antibody. T.F. Baumert acknowledges funding
16 by the European Union (ERC-2008-AdG-233130-HEPCENT and Interreg IV FEDER-
17 Hepato-Regio-Net 2009 and 2012), the Agence Nationale de Recherches sur le SIDA
18 (ANRS) (2012/239, 2012/318, 2013/108), the Direction Générale de l'Offre de Soins
19 (A12027MS), and the French National "Investissement d'Avenir" LabEx HEPSYS (ANR-
20 10-LABX-28). D.J. Felmler acknowledges fellowships from European Association for
21 Study of the Liver (EASL) and ANRS. R. Bartenschlager was supported by the
22 Deutsche Forschungsgemeinschaft, FOR1202, TP1. P. Meuleman was supported by
23 the Research Foundation Flanders (FWO project #3G052112), the Ghent University

1 (GOA #01G01712) and the Belgian state (IUAP P7/47-HEPRO2). C. Schuster
2 acknowledges funding by ANRS (2010-307/2011-415). The authors thank J. Boileau
3 (Strasbourg University Hospitals) for clinical samples and F. Stoll-Keller (Inserm U1110,
4 Laboratoire de Virologie, Strasbourg) for serum sample managing and support.

5

6 **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

7 D.J.F. and C.F.; S.F.-K. and T.F.B. contributed equally to this work. D.J.F., C.F., S.F.-K,
8 and T.F.B. wrote the manuscript. D.J.F., C.F., R.B., M.B.Z., C.S., S.F.-K, and T.F.B.
9 designed experiments. D.J.F., C.F., M.L., L.H., K.V, I.F. performed experiments. D.J.F.,
10 C.F., R.B., I.F., M.B.Z., P.M., C.S., S.F.-K, and T.F.B. analyzed data. M-S.H., R.B.,
11 A.H.P., and F.H. contributed essential reagents. T.F.B. initiated and directed the project.
12 S.F.-K co-supervised part of the team.

13

14 **COMPETING FINANCIAL INTERESTS**

15 The authors have no conflicting interests to disclose.

16

REFERENCES

- 1
2 1. Yamane D, McGivern DR, Masaki T, & Lemon SM (2013) Liver injury and
3 disease pathogenesis in chronic hepatitis C. *Curr Top Microbiol Immunol*
4 369:263-288.
- 5 2. Nabel GJ (2013) Designing tomorrow's vaccines. *N Engl J Med* 368(6):551-560.
- 6 3. von Hahn T, *et al.* (2007) Hepatitis C virus continuously escapes from
7 neutralizing antibody and T-cell responses during chronic infection in vivo.
8 *Gastroenterology* 132(2):667-678.
- 9 4. Osburn WO, *et al.* (2010) Spontaneous control of primary hepatitis C virus
10 infection and immunity against persistent reinfection. *Gastroenterology*
11 138(1):315-324.
- 12 5. Feinstone SM, Hu DJ, & Major ME (2012) Prospects for prophylactic and
13 therapeutic vaccines against hepatitis C virus. *Clin Infect Dis* 55 Suppl 1:S25-32.
- 14 6. Andre P, *et al.* (2002) Characterization of low- and very-low-density hepatitis C
15 virus RNA-containing particles. *J Virol* 76(14):6919-6928.
- 16 7. Merz A, *et al.* (2011) Biochemical and morphological properties of hepatitis C
17 virus particles and determination of their lipidome. *J Biol Chem* 286(4):3018-
18 3032.
- 19 8. Bartenschlager R, Penin F, Lohmann V, & Andre P (2011) Assembly of infectious
20 hepatitis C virus particles. *Trends Microbiol* 19(2):95-103.
- 21 9. Zeisel MB, Felmlee DJ, & Baumert TF (2013) Hepatitis C virus entry. *Curr Top*
22 *Microbiol Immunol* 369:87-112.

- 1 10. Fafi-Kremer S, *et al.* (2010) Viral entry and escape from antibody-mediated
2 neutralization influence hepatitis C virus reinfection in liver transplantation. *J Exp*
3 *Med* 207(9):2019-2031.
- 4 11. Fofana I, *et al.* (2012) Mutations that alter use of hepatitis C virus cell entry
5 factors mediate escape from neutralizing antibodies. *Gastroenterology*
6 143(1):223-233 e229.
- 7 12. Wakita T, *et al.* (2005) Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture
8 from a cloned viral genome. *Nat Med* 11(7):791-796.
- 9 13. Yee MS, *et al.* (2008) Lipoprotein separation in a novel iodixanol density
10 gradient, for composition, density, and phenotype analysis. *J Lipid Res*
11 49(6):1364-1371.
- 12 14. Chen J, Li Q, & Wang J (2011) Topology of human apolipoprotein E3 uniquely
13 regulates its diverse biological functions. *Proc Natl Acad Sci U S A*
14 108(36):14813-14818.
- 15 15. Timpe JM, *et al.* (2008) Hepatitis C virus cell-cell transmission in hepatoma cells
16 in the presence of neutralizing antibodies. *Hepatology* 47(1):17-24.
- 17 16. Brimacombe CL, *et al.* (2011) Neutralizing antibody-resistant hepatitis C virus
18 cell-to-cell transmission. *J Virol* 85(1):596-605.
- 19 17. Weisgraber KH, *et al.* (1986) Human apolipoprotein E. Determination of the
20 heparin binding sites of apolipoprotein E3. *J Biol Chem* 261(5):2068-2076.
- 21 18. Fofana I, *et al.* (2013) A Novel Monoclonal Anti-CD81 Antibody Produced by
22 Genetic Immunization Efficiently Inhibits Hepatitis C Virus Cell-Cell Transmission.
23 *PLoS One* 8(5):e64221.

- 1 19. Krey T, *et al.* (2010) The disulfide bonds in glycoprotein E2 of hepatitis C virus
2 reveal the tertiary organization of the molecule. *PLoS Pathog* 6(2):e1000762.
- 3 20. Bankwitz D, *et al.* (2010) Hepatitis C virus hypervariable region 1 modulates
4 receptor interactions, conceals the CD81 binding site, and protects conserved
5 neutralizing epitopes. *J Virol* 84(11):5751-5763.
- 6 21. Grove J, *et al.* (2008) Identification of a residue in hepatitis C virus E2
7 glycoprotein that determines scavenger receptor BI and CD81 receptor
8 dependency and sensitivity to neutralizing antibodies. *J Virol* 82(24):12020-
9 12029.
- 10 22. Benga WJ, *et al.* (2010) Apolipoprotein E interacts with hepatitis C virus
11 nonstructural protein 5A and determines assembly of infectious particles.
12 *Hepatology* 51(1):43-53.
- 13 23. Catanese MT, *et al.* (2013) Ultrastructural analysis of hepatitis C virus particles.
14 *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(23):9505-9510.
- 15 24. Prentoe J, *et al.* (2011) Hypervariable region 1 differentially impacts viability of
16 hepatitis C virus strains of genotypes 1 to 6 and impairs virus neutralization. *J*
17 *Virol* 85(5):2224-2234.
- 18 25. Linton MF, *et al.* (1991) Phenotypes of apolipoprotein B and apolipoprotein E
19 after liver transplantation. *J Clin Invest* 88(1):270-281.
- 20 26. Feng Z, *et al.* (2013) A pathogenic picornavirus acquires an envelope by
21 hijacking cellular membranes. *Nature* 496(7445):367-371.
- 22 27. Lupberger J, *et al.* (2011) EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus
23 entry and possible targets for antiviral therapy. *Nat Med* 17(5):589-595.

- 1 28. Macdonald A, *et al.* (2003) The hepatitis C virus non-structural NS5A protein
2 inhibits activating protein-1 function by perturbing ras-ERK pathway signaling. *J*
3 *Biol Chem* 278(20):17775-17784.
- 4 29. Law M, *et al.* (2008) Broadly neutralizing antibodies protect against hepatitis C
5 virus quasispecies challenge. *Nat Med* 14(1):25-27.
- 6 30. Pietschmann T, *et al.* (2006) Construction and characterization of infectious
7 intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proc Natl Acad Sci*
8 *U S A* 103(19):7408-7413.
- 9 31. Lindenbach BD, *et al.* (2005) Complete replication of hepatitis C virus in cell
10 culture. *Science* 309(5734):623-626.
- 11 32. Zona L, *et al.* (2013) HRas signal transduction promotes hepatitis C virus cell
12 entry by triggering assembly of the host tetraspanin receptor complex. *Cell Host*
13 *Microbe* 13(3):302-313.

14

15

16

1 **FIGURE LEGENDS**

2 **Figure 1. VL:JFH1 in low-density fractions is capable of escaping neutralizing**
3 **antibodies.** HCVcc produced from cells transfected with either Jc1 or VL:JFH1 HCV
4 RNA was fractionated using iodixanol density gradient ultracentrifugation. Each fraction
5 was assayed for infectivity by end point dilution assay (TCID₅₀/mL). (A) The mean
6 percentage of infectivity of viruses for each fraction from three independent experiments
7 is represented by blue lines with circles (VL:JFH1), black lines with squares (Jc1) and
8 error bars represent \pm SEM. (B) Summarized data of percentage of infectivity below
9 1.05 g/ml \pm SEM is shown for three independent experiments. (C) VL:JFH1 HCVcc in
10 different density gradient fractions were tested for neutralization by incubating with
11 either serum from a patient with genotype 1b or 3a HCV infection or with serum from a
12 non-infected patient as a control at dilution 1/400. Results are expressed as the mean
13 percentage of infectivity relative to the fraction incubated with control serum for three
14 independent experiments \pm SEM. Significant differences between fractions are noted by
15 brackets. * $P < 0.05$

16

17 **Figure 2. Genetic knockdown of apoE sensitizes HCV to neutralization.** Huh7.5.1
18 cells were either electroporated with VL:JFH1 RNA alone (VL), or VL:JFH1 RNA co-
19 electroporated with either scrambled siRNA (siCTRL) or siRNA targeting apoE mRNA
20 (siapoE). Cell culture media were replaced 4h and 24h post electroporation and media
21 were collected 72h post electroporation. ApoE knockdown was confirmed 72h post
22 electroporation by immunoblotting (lower panel); actin was detected as loading control.
23 Results of neutralization assay of viruses produced from these cells using indicated

1 dilutions of serum from a patient infected with a genotype 1 virus is shown in the top
2 panel. Results are expressed as \log_{10} (TCID₅₀/ml). Means \pm SEM from three
3 experiments are shown.

4
5 **Figure 3. ApoE and cell-to-cell transmission of HCV.** (A) Interference of cell-to-cell
6 transmission of Jc1 and VL:JFH1 by anti-apoE antibody 1D7, non-specific IgG as a
7 negative control (Ctrl), or anti-CD81 as a positive control was tested (18). For cell-to-cell
8 transmission, GFP-expressing naïve target cells were co-cultured with cells containing
9 HCV with neutralizing antibody AP33. Representative results of FACS analysis are
10 shown. The quantity of positively stained cells for HCV E2 (y axis), and GFP labeled
11 target cells (x axis) are represented. (B) Histogram of cell-to-cell transmission for Jc1
12 and VL:JFH1 summarized from three independent experiments performed in duplicate
13 is shown. Values represent percentage of cell-to-cell transmission relative to control. *
14 $P < 0.01$ (C) The capacity of antibodies to inhibit infection was tested by inoculation of
15 naïve Huh7.5.1 cells with HCV in the presence of antibodies specified below the plot.
16 Values were normalized to those obtained with non-specific IgG (Ctrl). Means \pm SD
17 from three experiments are shown. * $P < 0.01$

18
19 **Figure 4. Envelope glycoprotein E2 residue 447 alters escape from nAbs through**
20 **modulation of apoE-HCV interactions.** (A) F447L or F447A was introduced into
21 VL:JFH1 HCVcc by site-directed mutagenesis. HCVcc were incubated with 1D7, which
22 targets the LDLr-binding domain of apoE, at serial dilutions or with control IgG (Ctrl)
23 prior to infection of Huh7.5.1 cells. Infectivity was assessed by TCID₅₀. Results are
24 expressed as percentage infectivity relative to Ctrl. Means \pm SEM from three

1 experiments are shown. * $P < 0.05$ (D) HCVcc derived from strain VL; F447L from strain
2 VA; or F447A were immunoprecipitated using IgG control (Ctrl), or three different anti-
3 apoE Abs (1D7, 3H1, 6C5). HCV RNA was extracted from precipitates and quantified by
4 qRT-PCR. Results are expressed as fold of increase relative to HCV RNA
5 immunoprecipitated with IgG control antibody from two independent experiments.

Fig. 1

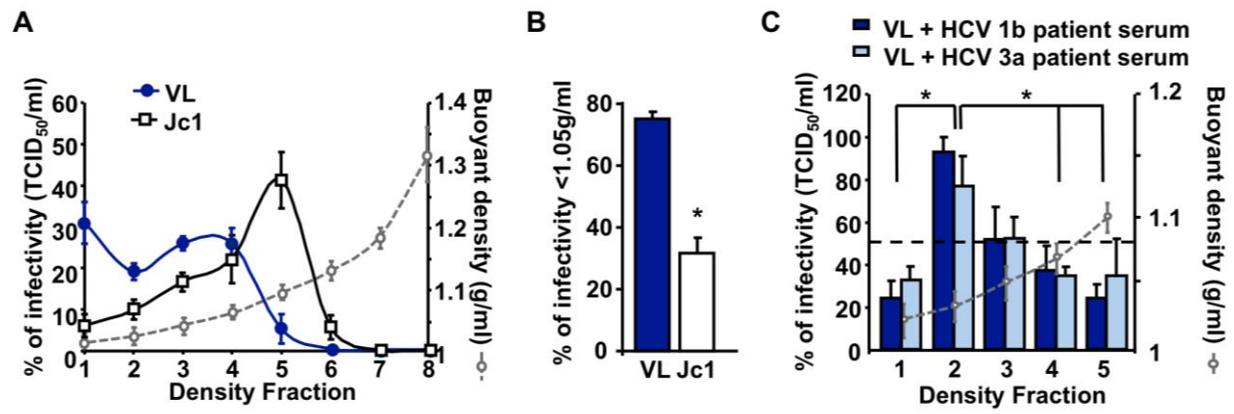


Fig. 2

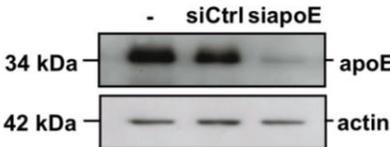
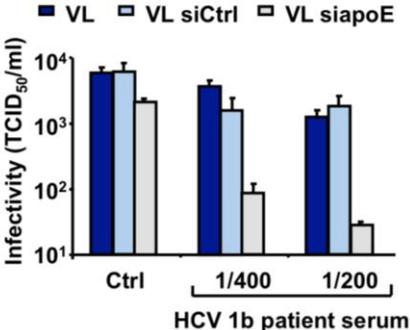


Fig. 3

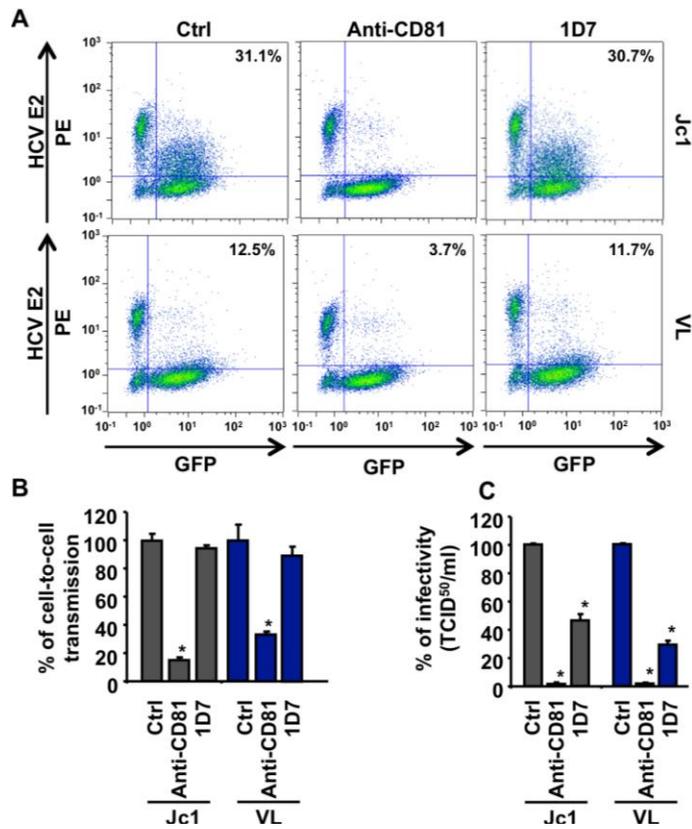
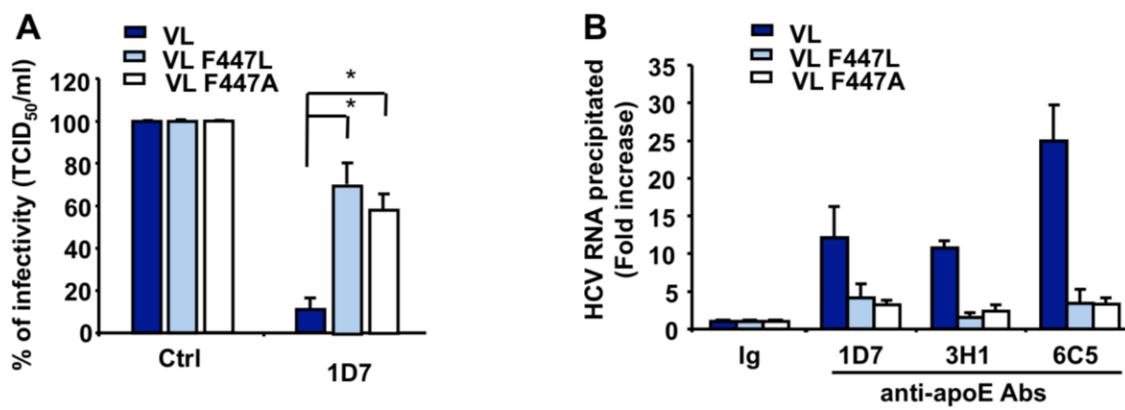


Fig. 4



Supporting Information

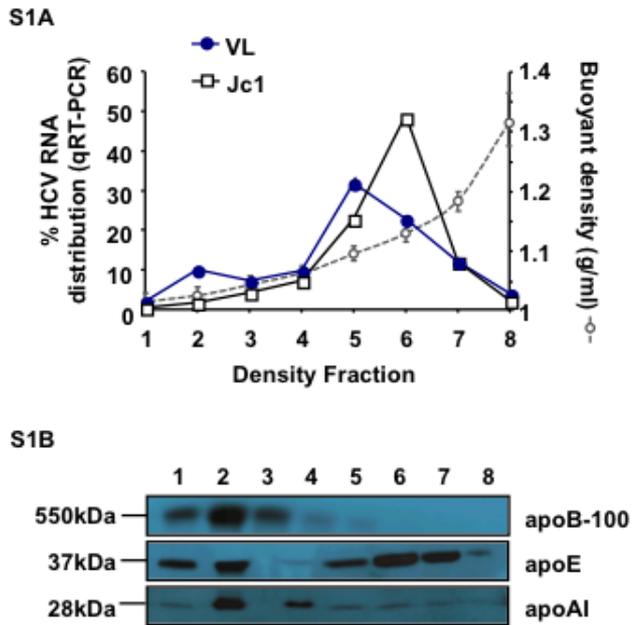


Fig. S1. Distribution of HCV RNA and apolipoproteins by density gradient. Fractions from supernatants of Jc1 and VL:JFH transfected cells from Fig. 1 were analyzed for HCV RNA (S1A) by qRT-PCR, and for apolipoprotein content (S1B) by immunoblotting with antibodies recognizing apoB, apoE, and apoAI, respectively.

S2

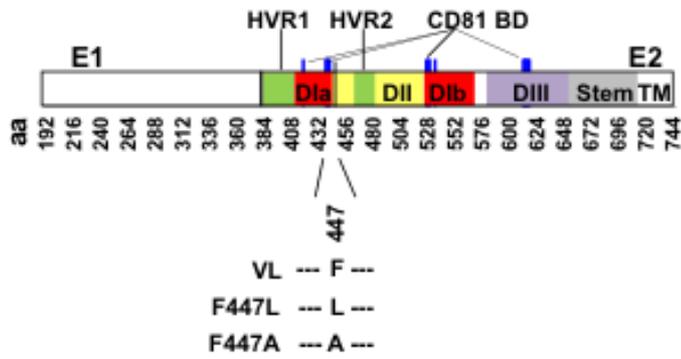


Fig. S2. Genomic organization of HCV E1E2 glycoproteins. HVR1 and HVR2 (green); E2 domains according to (Krey et al., 2010) are depicted in red (DI), yellow (DII), and purple (DIII); CD81 binding domains (BD) are depicted with dark blue bars. Position 447 is indicated by the black vertical line. Numbers below the bar refer to E1 and E2 amino acid residues of isolate H77(GenBank#: AAB67038.1). Analyzed mutations are shown.

Etude des facteurs viraux et cellulaires impliqués dans l'échappement du virus de l'hépatite C au cours de la transplantation hépatique

La cirrhose et le carcinome hépatocellulaire liés au virus de l'hépatite C (HCV) sont des indications majeures de transplantation hépatique. La réinfection du greffon par le HCV est systématique et sans moyen de prévention. Les mécanismes par lesquels le virus échappe au système immunitaire afin de réinfecter le greffon sont mal connus. Ce travail de thèse a permis d'identifier de nouveaux mécanismes et des déterminants clés impliqués dans la persistance virale. Nous avons identifié que l'utilisation des facteurs d'entrée cellulaires par le HCV évolue simultanément avec ses capacités d'échappement aux nAbs, et démontré qu'apoE est un composant clé des lipoparticules virales intervenant dans la persistance du HCV. L'identification de nouveaux facteurs viraux et cellulaires impliqués dans l'échappement viral, apporte de nouvelles perspectives dans le développement de nouvelles stratégies de prévention de la réinfection ainsi que dans le développement d'un vaccin prophylactique.

Mots-clés : Hépatite C, transplantation, persistance, lipoprotéine

Hepatitis C virus (HCV)-cirrhosis and HCC are leading indications for liver transplantation. Reinfection of the liver graft is universal and no way of prevention exists. Mechanisms employed by HCV to evade the immune system and reinfect the liver graft are unknown. This thesis work identified new mechanisms and key determinants involved in viral persistence. We identified a novel clinically and therapeutically important mechanism of viral evasion, where coevolution simultaneously occurs between cellular entry factor use and escape from neutralization. We also discovered that virus-apoE interaction is unique mechanism of viral evasion from neutralizing antibodies. Identification of new viral and host factors involved in viral escape paves the way in the development of new prevention strategies and prophylactic vaccine.

Keywords: Hepatitis C, transplantation, persistence, lipoprotein