

**THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ LILLE II**

École Doctorale Biologie et Santé de Lille

Pour l'obtention du grade de :  
**Docteur de l'Université Lille II**

**L'EGCG et la delphinidine : deux nouvelles molécules naturelles  
inhibant l'entrée du virus de l'hépatite C**

EGCG and delphinidin: two new natural inhibitors of hepatitis C virus entry

Dirigée par :  
Mme. Karin SÉRON

Présentée et soutenue publiquement par :

**Noémie CALLAND**

Le 23 Novembre 2012

Devant le Jury composé de :

M. Didier HOBER

M. David DURANTEL

M. Philip MEULEMAN

M. Dimitri LAVILLETTE

Mme. Karin SÉRON

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Directrice de thèse



*« Les yeux sont aveugles. Il faut chercher avec le cœur. »*

*Antoine de Saint-Exupéry*



À mes parents,  
À ma sœur,  
À ma famille,  
À Céline,

mon oxygène,  
mes soutiens sans faille ...



## - Remerciements -

Voilà, l'heure a sonné ... Il est temps, je crois, de faire le bilan de ces trois années ! Elles sont bien vite passées, il faut l'avouer ! L'exercice des remerciements peut commencer ...

Tout d'abord, je tiens à remercier les membres de mon jury de thèse : Didier Hober, David Durantel, Philip Meuleman et Dimitri Lavillette pour l'intérêt qu'ils portent à mon travail. Un merci spécial à Didier Hober et Dimitri Lavillette pour m'avoir accueilli au sein de vos laboratoires, le temps de reviews pour un papier ou d'un stage d'été ...

Ensuite, je tiens à remercier le grand chef du labo, Jean, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire. Grâce à ton autorisation, j'ai pu participer à de nombreux congrès et j'ai pu visiter de nombreux pays (qui ne profite pas des congrès pour parfaire sa culture générale et approfondir ses connaissances sur le pays visité ?) ... Merci de m'avoir fait confiance au cours de ces occasions. Je te remercie aussi pour la culture « écolo » enseignée au labo : surtout ne jetez pas vos sachets de thé, ils servent d'engrais pour les plantes (et en plus ils sont efficaces contre le virus de l'hépatite C !). J'espère qu'au cours de ces trois années, ton foie n'a pas trop souffert des petites gourmandises provenant de l'Est de la France ! Merci également de nous faire partager les mœurs belges ... (et oui, les tartines sont de rigueur le midi dans le bureau du grand chef ! ☺).

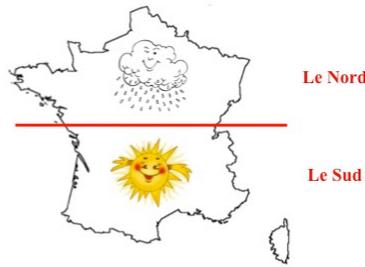
Ensuite, je tiens à remercier mon, ou devrais-je plutôt dire, mes directeurs de thèse ... car, pour moi, vous avez contribué, aussi bien l'un que l'autre, au bon déroulement de cette thèse !

Tout d'abord, ma directrice officielle ! Karin, merci de m'avoir tant apporté scientifiquement et humainement parlant ... Je te remercie pour ton soutien sans faille, ta confiance, nos discussions dans le bureau (scientifiques ... mais pas que !), ta disponibilité au quotidien, les petits coups de pied aux fesses gentiment amenés lorsque j'en avais besoin ... J'espère t'avoir donné l'envie de reprendre un (ou une) autre étudiant(e) en thèse pour qu'il (ou qu'elle) continue le beau projet que nous avons commencé ensemble !

Passons maintenant à mon autre directeur ( ... celui qui n'apparaît pas sur les papiers administratifs !). Yves, j'ai commencé mes pas au labo sous ta direction (Karin étant enceinte à l'époque, c'est toi qui a hérité du gros lot !). Tu m'as appris les immunofluorescences un certain mercredi 21 octobre 2009 ... depuis, je pense que j'ai rentabilisé la technique ! Merci pour ton soutien et ta confiance au cours de ces trois années ... Merci aussi pour ton humour, qui contribue largement à la bonne ambiance du labo ! Tes pulls, tes chaussures, tes étourderies, tes blagues et les divers faits relatés concernant tes enfants, pour sûr, je ne les oublierai pas !

Je remercie Sandrine pour sa toujours bonne humeur et ses blagues (toi aussi tu as eu un bon professeur pendant ta thèse !). Parce que pour les Ch'timis le beau temps n'a pas la même signification que par chez nous, je pense que tu seras d'accord avec ce qui suit ...

La météo, l'été, en France ...



et après ça les Ch'timis vous diront que dans le Nord, il ne pleut pas tant que ça ! ...

Merci également au plus chauvin de tous les Ch'timis ... Thibaut pour m'avoir fait découvrir cette région qui lui tient tant à cœur ... Merci pour les nombreuses sorties en Belgique, dans le Nord, l'agréable séjour à Amsterdam ... Je reste sur mes positions, ici, il n'y a pas de montagnes, il n'y a que des plaines ... Voilà une petite phrase, qui me semblait bien énigmatique ... « Oui j'utilise une wassingue, j'armonte min carreau, j'prononce mes « T » à la fin d'vingt, j'écris au crayon dbos, j'minge des chicons, j'sais que Ch'59 et Ch'62 chei pas l'même ... si ti auchi té fier d'être deuch Nord et bien t'es fait passé hé pis si t'eu veut pas eul'faire bin ché pa grafe, te fais une bise quand même. » ... mais grâce à ton enseignement, elle me semble un peu plus familière aujourd'hui !

Je remercie mes voisines de bureau, Laurence et Julie pour m'avoir supporté ... surtout ces derniers temps !

Merci à Laurence pour me laisser largement empiéter sur son bureau et pour m'avoir accueilli au sein du bureau « Wint ».

Merci à Julie pour m'avoir hébergé à mes débuts au labo ...

Merci à Czes et André, les deux nounours du labo ... vos petites taquineries vont me manquer ...

Merci à Soph pour son aide informatique et toutes les questions concernant l'utilisation d'un mac ... (avec ces icônes qui disparaissent et ces bizarreries qui apparaissent !) ... Merci aussi pour les tuyaux concernant la Musique !

Merci à Nathalie pour son organisation des pots ... et toutes ses anecdotes !

Merci à Claire pour son sourire au quotidien ... et pour m'avoir confié la garde de Noisette à plusieurs reprises !

Merci à Rayan et Lucie F. pour tous les bons moments passés ensemble ...

Thanks to Ahmed and Yan... with you, I've improved a little bit my english! Enjoy France and good luck for the following years!

Bon courage et bienvenue aux nouvelles recrues : Muriel et Adeline.

Merci à toutes les personnes que j'ai rencontrées au cours de ma thèse (et surtout les stagiaires qui ont dû supporter ma direction !) : Camille, Ioan, les deux Julien, Khaled (le petit

lapin !), Lucie D., Margot, Marion, Marlis, Philip, Pyd (le grand pigeon !), Sadaf, Sadia, Sohail, Xavier ...

Merci également à toutes celles et ceux qui contribuent au bon fonctionnement du laboratoire : Marie-Christine, Michelle, Gaëtanne, Priscillia, Sylvie, Daniel ...

Parce qu'ils constituent un pilier pour moi, je tiens également à remercier mes proches et mes amis.

*« L'amour véritable, un réseau de liens qui fait devenir. » (Antoine de Saint-Exupéry)*

Papa, Maman, merci de m'avoir inculqué toutes ces belles valeurs ! Merci de m'avoir toujours encouragé, soutenu et de m'avoir appris à me surpasser ... Merci pour tous les sacrifices que vous avez fait pour que je puisse en arriver là où je suis aujourd'hui ... et parce qu'on ne se le dit pas assez, je vous aime !

Merci aussi à mon petit num' d'avoir supporté ma mauvaise humeur qui, je l'avoue, nous a valu quelques petites discordes (enfin, quoi de plus normal entre deux sœurs !). Je voudrais juste te dire : *« Fais de ta vie un rêve, et d'un rêve une réalité. » (Antoine de Saint-Exupéry)* ... Parce que même si la vie n'est pas toujours rose, si tu te donnes les moyens d'y arriver, tu y arriveras ... crois toujours en toi !

Je remercie également tous les membres des familles Calland, Chapon, Curt, Sibelle et Co. pour avoir supporté, le temps d'un repas de famille, mes élucubrations et explications alambiquées concernant mon projet de thèse ... Merci à tous d'avoir fait semblant de comprendre ce que je radotais !

Je remercie plus particulièrement tatan Danielle, Mémé et Marraine pour la participation aux nombreux colis envoyés ... ils font du bien au moral (également à celui des membres du labo ...) et mettent du baume au cœur ! ... Merci aussi pour les coups de fils et tout le reste ...

*« Il faut autour de soi, pour exister, des réalités qui durent. » (Antoine de Saint-Exupéry)*

Céline, merci pour ton amitié sans faille ! Merci pour ton soutien, pour tous les bons moments passés ensemble, pour les séjours à Lyon ou ailleurs, pour les sorties (tu te rappelles de la danse du flagelle ?). Merci d'avoir cru en moi (quand moi-même je n'y croyais plus ...). Merci pour les rendez-vous téléphoniques, les conversations philosophiques ... Et surtout, merci pour toutes les choses que tu as faites pour moi quand le moral n'était pas là ...

*« Les camarades, la vie peut-être nous en écarte, nous empêche d'y beaucoup penser, mais ils sont quelque part, on ne sait où, silencieux mais tellement fidèles ! » (Antoine de Saint-Exupéry)*

Pour finir, je voudrais exprimer toute mon amitié aux personnes qui ont quitté le labo ... Merci à toutes mes « mamans » avec qui j'ai lié une amitié certaine : Anna, Birke, Gaby et Lucie G. Je repense, en écrivant ces mots, aux bons moments passés ensemble ... Merci à toutes d'avoir rendu le laboratoire plus qu'un lieu de travail. Je vous souhaite à toutes de trouver votre voie, où quelle puisse se trouver !

Merci à Guillemette pour m'avoir transmis sa passion et donné l'envie de faire de la Recherche ... sans toi, je ne sais pas si ces mots auraient été écrits ... Au plaisir de te revoir ...



## SOMMAIRE

<b>RÉSUMÉ</b>	<b>17</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>19</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b>	<b>21</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b>	<b>23</b>
<b>ABRÉVIATIONS</b>	<b>25</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>31</b>
<b>Partie I - L'Hépatite C</b>	<b>33</b>
<b>A. Foie et hépatite virale</b>	<b>33</b>
<b>1) Architecture du foie</b>	<b>33</b>
<i>a) Vue d'ensemble de l'organisation du foie</i>	<b>33</b>
i - Le lobule hépatique : unité fonctionnelle du foie	<b>33</b>
ii - Les travées cellulaires hépatiques	<b>33</b>
<i>b) Une vascularisation atypique</i>	<b>34</b>
<i>c) Les cellules du foie</i>	<b>35</b>
i - Les cellules parenchymateuses	<b>35</b>
ii - Les cellules non-parenchymateuses	<b>35</b>
<b>2) Les fonctions du foie</b>	<b>36</b>
<i>a) Métabolisme des lipides et des lipoprotéines</i>	<b>36</b>
<i>b) Les autres fonctions</i>	<b>36</b>
<b>3) L'Hépatite virale</b>	<b>37</b>
<b>B. L'Hépatite C</b>	<b>38</b>
<b>1) Distribution géographique</b>	<b>38</b>
<b>2) Modes de transmission</b>	<b>39</b>
<b>3) Pathologie et évolution de la maladie</b>	<b>40</b>

<i>a) L'hépatite C aigüe</i>	40
<i>b) L'hépatite C chronique</i>	40
<b>4) Diagnostic de l'hépatite C</b>	<b>41</b>
<i>a) Le premier test diagnostique pour l'hépatite C</i>	42
<i>b) Diagnostic indirect de l'infection par le HCV</i>	42
<i>c) Diagnostic direct de l'infection par le HCV</i>	42
<i>d) Détermination du génotype viral</i>	43
<b>5) Réponse immunitaire au cours de l'infection par le virus de l'hépatite C</b>	<b>43</b>
<i>a) Réponse immunitaire innée</i>	44
<i>b) Réponse immunitaire adaptative</i>	45
i - Réponse immunitaire adaptative cellulaire	46
ii - Réponse immunitaire adaptative humorale	47
iii - Mémoire immunitaire	48
<i>c) Réponse immune et progression de la maladie</i>	50
<b>6) Les thérapies</b>	<b>50</b>
<i>a) De la bithérapie ...</i>	51
i - L'interféron	51
ii - La ribavirine	52
iii - Les résultats obtenus avec la bithérapie ...	53
iv - Le polymorphisme du gène <i>IL-28B</i> : une découverte majeure de l'année 2009	54
<i>b) ... à la trithérapie ...</i>	54
i - Le bocéprévir	55
ii - Le télaprévir	56
<i>c) ... en passant par la découverte d'autres molécules ...</i>	57
i - Les autres inhibiteurs de protéase	59
ii - Les inhibiteurs de la protéine virale NS5A	60
iii - Les inhibiteurs de la polymérase	60
• Les inhibiteurs nucléos(t)idiques	60
• Les inhibiteurs non-nucléos(t)idiques	61
iv - Les inhibiteurs des protéines et des facteurs de l'hôte impliqués dans le cycle du virus de l'hépatite C	61
• Les inhibiteurs des cyclophilines	61
• Les inhibiteurs du microRNA-122	62

• Les autres inhibiteurs	62
d) ... vers un traitement sans interféron ?	62
7) Perspective de vaccination	63
<b>Partie II - Le virus de l'hépatite C</b>	<b>67</b>
<b>A. Découverte du virus de l'hépatite C</b>	<b>67</b>
<b>B. Généralités sur le virus de l'hépatite C</b>	<b>67</b>
1) Classification et variabilité génomique	67
2) Propriétés biophysiques de la particule virale	69
3) Organisation génomique	70
a) Vue d'ensemble du génome du virus de l'hépatite C	70
b) La région 5' non codante	71
c) La région 3' non codante	71
4) Les protéines codées par le génome du virus de l'hépatite C et leur rôle au cours du cycle viral infectieux	72
a) Le clivage de la polyprotéine, la localisation subcellulaire et l'ancrage membranaire des protéines virales du virus de l'hépatite C	72
b) Les protéines structurales	73
i - La protéine de capsid : core	73
ii - ARFP, une onzième protéine virale ...	75
iii - Les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2	75
c) Les protéines non structurales	78
i - La protéine p7	78
ii - La protéine NS2	79
iii - La protéase NS3/4A et l'hélicase NS3	79
iv - La protéine NS4B	81
v - La protéine NS5A	81
vi - La protéine NS5B	83
<b>C. Modèles d'étude</b>	<b>83</b>
1) Les modèles d'étude de l'infection par le virus de l'hépatite C	84
a) Le modèle simien : le chimpanzé	84
b) Les modèles murins	84
2) Les modèles cellulaires	85
a) Les cellules infectées par le virus de l'hépatite C isolé de sera de patients	86
b) Les pseudovirions du virus de l'hépatite C et les virosomes	86

<i>c) Les réplicons</i>	87
<i>d) Les particules rétrovirales pseudotypées avec les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2</i>	88
<i>e) Les particules virales produites en culture cellulaire</i>	90
<i>f) Les hépatocytes primaires humains</i>	93
<b>D. Le cycle viral infectieux du virus de l'hépatite C</b>	<b>93</b>
<b>1) Le processus d'entrée virale</b>	<b>94</b>
<i>a) Les facteurs d'attachement</i>	95
i - Les lectines	95
ii - Les glycosaminoglycanes	96
iii - Le récepteur des lipoprotéines de faible densité	97
<i>b) Les facteurs d'entrée spécifiques</i>	98
i - La protéine CD81 et la molécule EWI-2 wint	98
ii - Le récepteur SR-BI	99
iii - Les protéines des jonctions serrées : Claudine-1 et compagnie ... , Occludine	100
iv - Les récepteurs EGFR et EphA2	101
v - Le récepteur d'absorption du cholestérol Niemann-Pick C1-Like 1	101
<i>c) L'internalisation</i>	102
<i>d) La fusion</i>	102
<b>2) Traduction et synthèse des protéines virales</b>	<b>103</b>
<b>3) Réplication de l'ARN génomique viral</b>	<b>103</b>
<b>4) Assemblage et sécrétion des virions néo-synthétisés</b>	<b>104</b>
<b>5) La transmission du virus de cellule à cellule</b>	<b>105</b>
<b>Partie III - Les flavonoïdes</b>	<b>107</b>
<b>A. Généralités sur les flavonoïdes</b>	<b>107</b>
<b>1) Structure de base des flavonoïdes</b>	<b>107</b>
<b>2) Distribution et localisation des flavonoïdes</b>	<b>110</b>
<i>a) Distribution</i>	110
<i>b) Localisation</i>	110
<b>3) Biosynthèse et régulation</b>	<b>110</b>
<i>a) Biosynthèse</i>	110
i - La voie du shikimate	110
ii - La voie de l'acétate-malonate	111

iii - Vers la biosynthèse des flavonoïdes ...	111
b) <i>Régulation</i>	113
4) <b>Fonction des flavonoïdes</b>	113
5) <b>Propriétés physico-chimiques des flavonoïdes</b>	114
a) <i>Solubilité</i>	114
b) <i>Couleurs et propriétés spectrales</i>	114
6) <b>Propriétés biologiques des flavonoïdes</b>	114
<b>B. L'épigallocatechine-3-gallate</b>	115
1) <b>Généralités sur le thé</b>	115
2) <b>Les flavan-3-ols : les principes flavonoïdiques actifs du thé vert</b>	115
3) <b>Effets associés à l'EGCG</b>	116
a) <i>Effets généraux de l'EGCG</i>	116
b) <i>Effets antiviraux associés à l'EGCG</i>	117
i - Les virus enveloppés	117
ii - Les virus non enveloppés	118
c) <i>Pharmacologie</i>	118
i - Biodisponibilité	118
ii - Absorption intestinale et métabolisme	118
d) <i>Facteurs influençant la biodisponibilité de l'EGCG</i>	119
<b>C. La delphinidine</b>	119
1) <b>Généralités sur les anthocyanidines</b>	119
2) <b>La delphinidine : une molécule retrouvée dans de nombreux aliments</b>	120
3) <b>Pharmacologie</b>	120
a) <i>Biodisponibilité de la delphinidine</i>	120
b) <i>Absorption et métabolisme</i>	121
c) <i>Différents facteurs pouvant influencer la stabilité et la biodisponibilité de la delphinidine</i>	121
<b>D. Le virus de l'hépatite C et les composés naturels : une nouvelle stratégie antivirale ? (Hepatitis C Virus and natural compounds: a new antiviral approach?) - revue</b>	122
<b>OBJECTIFS</b>	125

<b>RÉSULTATS</b>	<b>129</b>
<b>Partie I</b> : L'épigallocatechine-3-gallate, un nouvel inhibiteur de l'entrée du virus de l'hépatite C	131
<b>Partie II</b> : La delphinidine, une molécule possédant un mode d'action comparable à celui de l'épigallocatechine-3-gallate	135
<b>DISCUSSION-PERSPECTIVES-CONCLUSIONS</b>	<b>157</b>
<b>Résumé des résultats</b>	<b>159</b>
<b>L'épigallocatechine-3-gallate, la delphinidine et l'entrée virale</b>	<b>159</b>
<b>L'épigallocatechine-3-gallate et la réplication</b>	<b>160</b>
<b>Action de l'EGCG et de la delphinidine sur le HCV</b>	<b>160</b>
<b>Utilisation de l'EGCG et de la delphinidine comme traitement     antiviral contre l'hépatite C</b>	<b>161</b>
<b>Hypothèses concernant le mécanisme d'action de l'EGCG     et de la delphinidine</b>	<b>162</b>
<b>Perspectives</b>	<b>162</b>
<b>Conclusion</b>	<b>164</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>167</b>

## RÉSUMÉ

L'hépatite C est un problème majeur de santé publique qui touche environ cent soixante millions de personnes dans le monde. L'agent étiologique responsable de cette maladie, le virus de l'hépatite C (HCV) est un petit virus enveloppé, dont le génome est codé par un acide ribonucléique (ARN) simple brin de polarité positive. Actuellement, il n'existe aucun vaccin contre ce pathogène et les traitements utilisés sont insatisfaisants du fait de leur spécificité d'action limitée et des nombreux effets secondaires qu'ils induisent. Ainsi, afin d'établir une thérapie antivirale efficace évitant l'apparition et la sélection de mutants de résistance aux antiviraux, l'utilisation de plusieurs agents antiviraux ciblant directement la particule virale (*direct-acting antiviral agents* ou DAAs) en combinaison est préconisée. C'est pourquoi la découverte de nouveaux DAAs à large spectre d'action ciblant diverses étapes du cycle viral infectieux est indispensable.

Au cours de ma thèse, nous avons identifié un nouvel inhibiteur de l'entrée du HCV : l'épigallocatechine-3-gallate (EGCG). Cette molécule, extraite du thé vert, inhibe l'infection des cellules par le HCV. Plus précisément, en utilisant des particules rétrovirales pseudotypées avec les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 du HCV, nous avons démontré que cette catéchine naturelle agit à une étape très précoce de l'entrée virale, indépendamment du génotype. De même, en nous servant du virus produit en culture cellulaire, nous avons montré que cette molécule agit directement sur la particule virale. Puis, par RT-PCR quantitative (*quantitative real-time polymerase chain reaction* ou qRT-PCR), nous avons confirmé l'inhibition de la liaison du virus à la surface cellulaire en présence d'EGCG. Par conséquent, nos travaux suggèrent que l'EGCG interagit avec la particule virale, probablement en se liant aux glycoprotéines d'enveloppe virales, bloquant ainsi une étape initiale d'attachement entre le virus et les facteurs cellulaires présents à la surface de l'hépatocyte. Puis, en inhibant la transmission libre du virus, à l'aide, soit d'agarose, soit d'anticorps neutralisants, nous avons démontré que l'EGCG inhibe la transmission du virus de cellule à cellule. Enfin, nous avons montré que l'EGCG élimine le virus présent dans le surnageant de culture cellulaire après quatre passages successifs sur des cellules naïves. La concentration d'EGCG, nécessaire pour inhiber la moitié de l'infection virale (*half maximal inhibitory concentration* ou IC<sub>50</sub>) en culture cellulaire, est 11 µM. Ainsi, afin d'identifier de nouvelles molécules présentant un mode d'action similaire à celui de l'EGCG et possédant une meilleure activité antivirale, nous avons sélectionné différentes molécules

naturelles et les avons testé pour leur potentiel effet anti-HCV. C'est ainsi que le chlorure de delphinidine, une anthocyanidine, a également été identifié en tant que nouvelle molécule inhibitrice de l'entrée du HCV. De même que l'EGCG, le chlorure de delphinidine cible directement la particule virale à une étape précoce de l'entrée, indépendamment du génotype, probablement en inhibant l'attachement du virus à la surface cellulaire et sans affecter ni l'étape de réplication, ni l'étape d'assemblage/maturation. De plus, le chlorure de delphinidine présente une activité anti-HCV améliorée avec une  $IC_{50}$  de 3,5  $\mu$ M.

Enfin, au cours de ma thèse, nous avons identifié deux nouvelles molécules naturelles inhibant l'étape d'entrée virale du HCV. Ces molécules pourraient être utilisées comme nouveau traitement en combinaison avec d'autres DAAs et pourraient également servir d'outil afin d'étudier les mécanismes d'entrée du HCV dans l'hépatocyte.

## ABSTRACT

Hepatitis C is a major global health burden with one hundred and sixty million infected individuals worldwide. This long-term disease, caused by a small positive-strand ribonucleic acid (RNA) enveloped virus, designated hepatitis C virus (HCV) evolves slowly. Nowadays, no vaccine is available and current treatments are unsatisfactory due to their restricted spectrum of action and the induction of many secondary effects. For this reason, it is suggested that the combination of several drugs will prevent viral resistance, which might result in a more efficient antiviral therapy. Thus, the discovery of new direct-acting antiviral agents (DAAs), with a broad spectrum of action, targeting different steps of the virus life cycle is still needed.

Here, we identified (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) as a new inhibitor of HCV entry. Epigallocatechin-3-gallate, extracted from green tea, inhibits HCV infection. More precisely, this natural catechin molecule acts at a very early step of entry regardless of the genotype as illustrated with HCV pseudoparticles expressing HCV envelope glycoproteins E1 and E2 assays and cell-culture assays. Moreover, this molecule inhibits the docking of the virus to the cell surface as shown by the quantification of bound viruses during the attachment step using quantitative real-time polymerase chain reaction. Furthermore, EGCG inhibits viral cell-to-cell transmission as demonstrated by using agarose or neutralizing antibodies assays. Finally, EGCG clears HCV from cell culture supernatants after four passages.

The half maximal inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) of EGCG in cell culture is approximately 11  $\mu$ M. In order to identify new molecules exhibiting an enhanced anti-HCV activity and displaying similarities from EGCG scaffold, a series of natural compounds were selected and were tested for their anti-HCV activities. Thus, the anthocyanidin delphinidin chloride was identified as another inhibitor of HCV entry. Like EGCG, delphinidin chloride acts directly on the virus at a very early step of entry, regardless of the genotype, probably by inhibiting the docking of the virus to the cell surface without affecting replication or viral assembly/secretion. Finally, with an  $IC_{50}$  of 3.5  $\mu$ M, delphinidin chloride displays a more potent anti-HCV activity.

Together, these data indicate that EGCG and delphinidin chloride are new interesting anti-HCV molecules that inhibit entry and might be used as a new treatment in combination with other DAAs. Furthermore, these two inhibitors might be novel tools to further dissect the mechanisms of HCV entry into the hepatocyte.



## LISTE DES FIGURES

Figure 1.	Architecture du foie.	34
Figure 2.	Structure d'une lipoprotéine.	36
Figure 3.	Prévalence de l'hépatite C dans le monde, en 2010.	38
Figure 4.	Évolution de l'incidence des hépatites virales suite à une transfusion sanguine.	39
Figure 5.	Évolution d'une hépatite causée par le HCV.	41
Figure 6.	Représentation schématique de la réponse immunitaire cellulaire au cours de l'infection par le HCV.	49
Figure 7.	Arbre phylogénétique de la famille des <i>Flaviviridae</i> .	68
Figure 8.	Répartition mondiale des différents génotypes du HCV.	69
Figure 9.	Représentation schématique d'une particule du HCV.	70
Figure 10.	Organisation génomique du HCV.	74
Figure 11.	Modèle représentant l'ectodomaine de la glycoprotéine d'enveloppe E2.	77
Figure 12.	Représentation schématique des réplicons du HCV.	88
Figure 13.	Représentation schématique du système de production des particules rétrovirales pseudotypées avec les glycoprotéines d'enveloppe du HCV (HCVpp).	90
Figure 14.	Représentation schématique de la production du virus de l'hépatite C en culture cellulaire (HCVcc).	91
Figure 15.	Cycle viral putatif du HCV.	94
Figure 16.	Modèle du mécanisme d'entrée du HCV dans les hépatocytes.	95
Figure 17.	Modèle d'assemblage du HCV.	106
Figure 18.	Structure commune des flavonoïdes.	107
Figure 19.	Structure du phloroglucinol et du résorcinol.	107
Figure 20.	Représentation schématique des différentes structures pouvant être retrouvées pour le cycle C du squelette des flavonoïdes.	108
Figure 21.	Formation du 4-coumaroyl-CoA, le précurseur des flavonoïdes.	111
Figure 22.	Schéma général de la voie de biosynthèse des flavanoïdes.	112
Figure 23.	Représentation schématique des différentes catéchines (flavan-3-ols) présentes dans le thé vert.	116
Figure 24.	Représentation de la structure de l'ion flavylum.	119

- Figure 25. Comparaison de la structure d'une anthocyanidine (la delphinidine)  
et d'un flavan-3-ol (l'EGCG). 120
- Figure 26. Les différentes formes en équilibre des anthocyanines en fonction du pH. 122

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.	Comparaison des principales caractéristiques concernant le télaprévir et le bocéprévir.	58
Tableau 2.	Les agents antiviraux ciblant directement la particule virale (DAAs) les plus prometteurs en cours d'étude.	59
Tableau 3.	Récapitulatif des différentes études menées en essai clinique de phase II concernant l'utilisation de diverses molécules en l'absence d'interféron.	65
Tableau 4.	Les principaux vaccins thérapeutiques et prophylactiques anti-HCV en cours d'étude clinique.	66
Tableau 5.	Les principales classes de flavonoïdes.	109



## ABRÉVIATIONS

### *A*

ADN	acide désoxyribonucléique
ADNccc	acide désoxyribonucléique circulaire clos de façon covalente
ALAT	alanine aminotransférases
APC	<i>antigen presenting cells</i> (cellules présentatrices de l'antigène)
Apo	<i>apolipoproteins</i> (apolipoprotéines)
ARN	acide ribonucléique
ARFP	<i>alternative reading frame protein</i>
ASAT	aspartate aminotransférases

### *C*

CARDIF	<i>CARD adapter inducing interferon-<math>\beta</math></i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CLDN	claudine
CTL	<i>cytotoxic T lymphocytes</i> (lymphocytes T cytotoxiques)

### *D*

DAAs	<i>direct-acting antiviral agents</i> (agents viraux ciblant directement la particule virale)
DC	<i>dendritic cells</i> (cellules dendritiques)
DC-SIGN	<i>dendritic cell-specific intracellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin</i>

### *E*

EGCG	<i>epigallocatechin-3-gallate</i> (épigallocatechine-3-gallate)
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i> (récepteur du facteur de croissance épidermique)
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
EMCV	<i>encephalomyocarditis virus</i> (virus de l'encéphalomyocardite)
EphA2	<i>ephrin receptor A2</i>

ER	<i>endoplasmic reticulum</i> (réticulum endoplasmique)
EWI	glutamine-tryptophane-isoleucine
EWI-2wint	<i>EWI-2 without its N-terminus</i>
<b><i>F</i></b>	
F	<i>frameshift protein</i>
FDA	<i>food and drug administration</i> (agence fédérale américaine des produits alimentaires et médicamenteux)
<b><i>G</i></b>	
GAG	glycosaminoglycanes
<b><i>H</i></b>	
HAV	<i>hepatitis A virus</i> (virus de l'hépatite A)
HBV	<i>hepatitis B virus</i> (virus de l'hépatite B)
HCV	<i>hepatitis C virus</i> (virus de l'hépatite C)
HCVcc	<i>cell-cultured HCV</i> (virus de l'hépatite C produit en culture cellulaire)
HCVpp	<i>hepatitis C virus pseudoparticles</i> (particules rétrovirales pseudotypées avec les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 du virus de l'hépatite C)
HDL	<i>high density lipoproteins</i> (lipoprotéines de haute densité)
HDV	<i>hepatitis D virus</i> (virus de l'hépatite D)
HEK	<i>human embryonic kidney cells</i> (cellules embryonnaires humaines de rein)
HEV	<i>hepatitis E virus</i> (virus de l'hépatite E)
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i> (virus de l'immunodéficience humaine)
Hsp90	<i>heat shock protein 90</i>
HSV	<i>herpes simplex virus</i> (virus herpès simplex)
HVR1	<i>hypervariable region 1</i> (région hypervariable 1)

## *I*

IC <sub>50</sub>	<i>half maximal inhibitory concentration</i> (concentration nécessaire pour inhiber 50% de l'infection virale)
IFN	interféron
IL	interleukine
IPS-I	<i>interferon-<math>\beta</math> promoter stimulator I</i>
IRES	<i>internal ribosome entry site</i> (site d'entrée interne des ribosomes)
ISG	<i>interferon-stimulated genes</i> (gènes stimulés par l'interféron)
IU	<i>international units</i> (unités internationales)

## *J*

JFH-1	<i>japanese fulminant hepatitis-isolate 1</i>
-------	---

## *K*

kDa	kilodaltons
-----	-------------

## *L*

L <sub>B</sub>	lymphocytes B
LD	<i>lipid droplets</i> (gouttelettes lipidiques)
LDL	<i>low-density lipoproteins</i> (lipoprotéines de faible densité)
LDL-R	<i>low-density lipoprotein receptor</i> (récepteur des lipoprotéines de faible densité)
LEL	<i>large extracellular loop</i> (grande boucle extracellulaire)
L-SIGN	<i>liver/lymph node-specific intracellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin</i>
L <sub>T</sub>	lymphocytes T

## *M*

MAVS	<i>mitochondrial antiviral signaling protein</i>
ml	millilitre

## *N*

NANB	non-A non-B
NK	<i>natural killer</i>
NPC1L1	<i>Niemann-Pick C1-Like 1</i>
NS	<i>non structural protein</i> (protéine non structurale)

## *O*

OCLDN	<i>occludine</i>
ORF	<i>open reading frame</i> (cadre ouvert de lecture)

## *P*

PEG	polyéthylène glycol
PEG-IFN- $\alpha$	<i>pegylated interferon alpha</i> (interféron alpha pégylé)
PKR	<i>protein kinase R</i> (protéine kinase R)
Protéine C	protéine core ou protéine de capsid

## *Q*

qRT-PCR	<i>quantitative real-time polymerase chain reaction</i>
---------	---

## *R*

RBV	ribavirine
RdRp	<i>RNA-dependent RNA polymerase</i> (ARN polymérase ARN-dépendante)
RIG-I	<i>retinoic acid-inducible gene I</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RT-PCR	<i>reverse transcription-polymerase chain reaction</i>

## *S*

SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i> (polymorphisme nucléotidique unique)
-----	--

SPRINT	<i>serine protease inhibitor therapy</i>
SR-BI	<i>scavenger receptor class B type I</i>
STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
SVR	<i>sustained virological response</i> (réponse virologique soutenue)

## *T*

TLR	<i>toll-like receptor</i>
TRIF	<i>toll/interleukin 1 receptor-domain-containing adapter inducing interferon-<math>\beta</math></i>

## *U*

uPA/SCID	<i>albumin-urokinase-type plasminogen activator/severe combined immunodeficiency</i>
UTR	<i>untranslated regions</i> (régions non codantes)

## *V*

VAP	<i>vesicle-associated membrane protein-associated protein</i>
VISA	<i>virus-induced-signaling adapter</i>
VLDL	<i>very low-density lipoproteins</i> (lipoprotéines de très faible densité)
VSV	<i>vesicular stomatitis virus</i> (virus de la stomatite vésiculaire)



# *INTRODUCTION*



## Partie I - L'Hépatite C

### A. Foie et hépatite virale

#### 1) Architecture du foie

##### a) Vue d'ensemble de l'organisation du foie

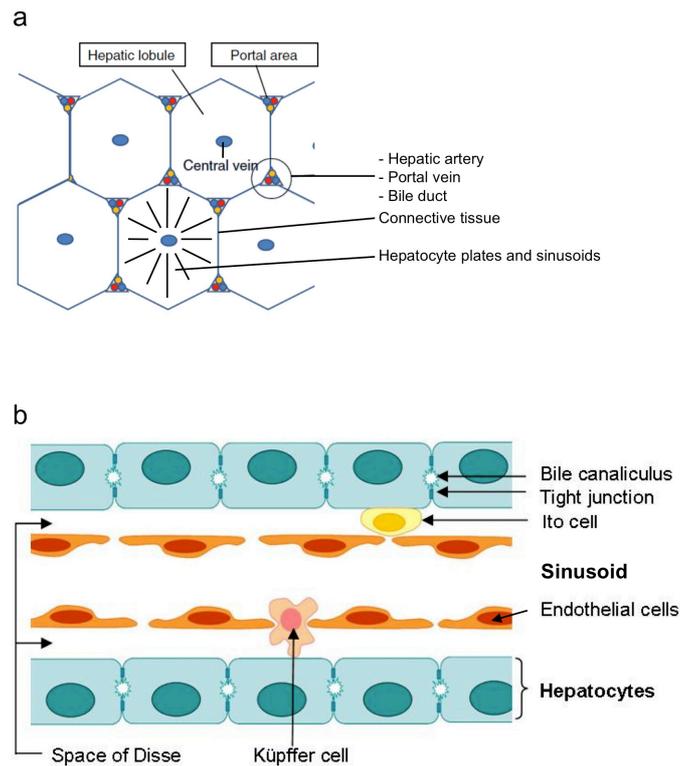
Le foie est l'organe le plus volumineux de l'organisme humain. Il est situé dans la partie supérieure droite de l'abdomen (Ishibashi *et al.*, 2009). Il est constitué de deux lobes inégaux : un lobe gauche et un lobe droit. Chaque lobe est divisé en secteurs (deux pour chaque lobe), eux-mêmes divisés en segments (huit au total). Le foie est entouré par une capsule de tissu conjonctif fibreuse : la capsule de Glisson. Les prolongements de cette dernière s'invaginent dans le parenchyme hépatique, divisant ainsi le foie en milliers de lobules. Connectée au foie par le canal cystique, la vésicule biliaire stocke la bile sécrétée par le foie sous forme concentrée. La bile sera déversée dans l'intestin lors de la digestion.

##### i - Le lobule hépatique : unité fonctionnelle du foie

Par définition, l'unité fonctionnelle du foie est le lobule hépatique (Figure 1a) (Ishibashi *et al.*, 2009). Cette entité, de forme hexagonale, est définie par l'ensemble des travées cellulaires hépatiques organisées de manière radiale autour d'une veine centrolobulaire. Plusieurs espaces portes délimitent un lobule hépatique que centre une veine centrolobulaire. L'espace porte comprend une branche de l'artère hépatique, une branche de la veine porte ainsi qu'un ou deux canaux biliaires.

##### ii - Les travées cellulaires hépatiques

Les travées cellulaires hépatiques sont polarisées (Figure 1b). Elles sont organisées de manière complexe pour assurer, d'une part, la production et l'écoulement de la bile, et d'autre part, les échanges avec le sang. Les microvillosités des hépatocytes sont entourées par des sinusoides hépatiques. Les sinusoides sont des vaisseaux dont la paroi est constituée par des cellules endothéliales formant un tapis discontinu. Les cellules endothéliales et les hépatocytes sont séparés par l'espace de Disse. La composition des liquides remplissant l'espace de Disse est identique à celle du plasma sanguin. Dans les travées, deux hépatocytes adjacents sont accolés à un canalicule biliaire. Ainsi, les sécrétions biliaires sont collectées et éliminées après acheminement jusqu'aux canaux biliaires présents dans l'espace porte.



**Figure 1. Architecture du foie.**

a. Représentation schématique des lobules hépatiques (*hepatic lobule*). Le sang circule de l'espace porte (*portal area*) vers la veine centrolobulaire (*central vein*) de chaque lobule, via les sinusoides (*sinusoids*) qui délimitent les travées cellulaires hépatiques (*hepatocyte plates*). L'espace porte comprend une branche de l'artère hépatique (*hepatic artery*), une branche de la veine porte (*portal vein*) ainsi qu'un ou deux canaux biliaires (*bile duct*).

b. Représentation détaillée des travées cellulaires hépatiques et des sinusoides. (*Bile canaliculus*, canalicule biliaire ; *tight junction*, jonction serrée ; *Ito cell*, cellule de Ito ; *sinusoid*, sinusoid hépatique ; *endothelial cells*, cellules endothéliales ; *hepatocytes*, hépatocytes ; *space of Disse*, espace de Disse ; *Kupffer cell*, cellule de Kupffer).

Adapté de (Ishibashi *et al.*, 2009).

### ***b) Une vascularisation atypique***

Le foie est très vascularisé. Il possède une double vascularisation afférente (par l'intermédiaire de l'artère hépatique et de la veine porte) et une vascularisation efférente (par l'intermédiaire des veines sus-hépatiques). La veine porte draine le sang veineux provenant de la cavité abdominale. Elle pénètre dans le foie par le hile. Elle se ramifie pour former les branches de la veine porte situées dans les espaces portes. L'artère hépatique approvisionne le foie en sang oxygéné. Elle pénètre également par le hile hépatique et se ramifie pour donner naissance aux branches de l'artère hépatique situées, elles aussi, dans les espaces portes. Les

échanges sanguins avec les cellules hépatiques se font au niveau des capillaires sinusoides. Puis, le sang emprunte la veine centrolobulaire et est acheminé jusqu'aux trois veines sus-hépatiques qui quittent le foie et se jettent dans la veine cave inférieure.

### ***c) Les cellules du foie***

Le foie est composé de deux catégories de cellules : les cellules parenchymateuses (les hépatocytes) et les cellules non-parenchymateuses (les cellules endothéliales, les cellules de Küpffer et les cellules de Ito) (Figure 1b) (Ishibashi *et al.*, 2009).

#### **i - Les cellules parenchymateuses**

Les hépatocytes sont polarisés. Ils possèdent un pôle basolatéral exposé au sang et un pôle apical constituant un réseau de canalicules biliaires (par accollement de leurs membranes). Cette polarité est maintenue par la présence de jonctions serrées qui contrôlent les échanges entre les pôles. Du fait de leurs importantes activités de transport, de sécrétion et de synthèse, les hépatocytes possèdent de nombreuses mitochondries, un appareil de Golgi très développé ainsi qu'un réticulum endoplasmique (ER) (lisse et granuleux) très abondant. Les hépatocytes peuvent également présenter des granules de glycogène, des gouttelettes lipidiques (LD) ainsi que des vésicules contenant des lipoprotéines de très faible densité (*very low-density lipoproteins* ou VLDL).

#### **ii - Les cellules non-parenchymateuses**

Les cellules non-parenchymateuses situées dans les sinusoides, sont encore appelées cellules sinusoidales hépatiques ou cellules endothéliales. Elles forment les parois des sinusoides hépatiques. Elles présentent des pores ou des fenestrations permettant le passage libre des solutés vers l'espace de Disse périsinusoïdal. Les cellules endothéliales empêchent donc l'immixtion du sang dans l'espace de Disse tout en autorisant les échanges entre le plasma et les hépatocytes par l'intermédiaire des pores.

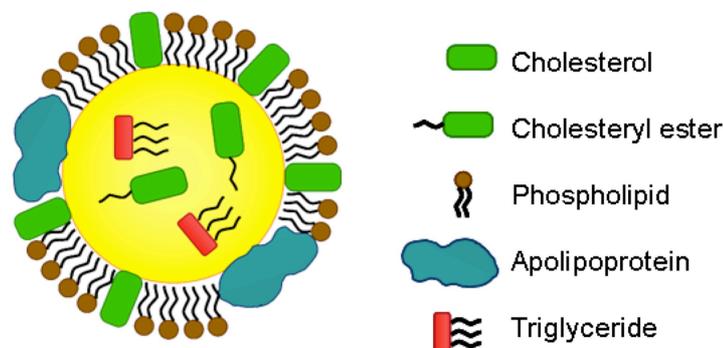
Les cellules de Küpffer sont des macrophages résidants du foie. Ces cellules sont impliquées dans le nettoyage des corps nécrotiques et apoptotiques ainsi que dans la phagocytose des particules étrangères arrivant de l'intestin avant qu'elles ne gagnent la circulation générale. Les cellules de Küpffer sont également impliquées dans de nombreux processus tels que la présentation des antigènes et la production de cytokines pro-inflammatoires.

Les cellules de Ito, encore appelées cellules hépatiques étoilées ou lipocytes sont situées dans l'espace de Disse. Elles possèdent un cytoplasme contenant des inclusions lipidiques (telles que les LD). Ces cellules ont pour fonction de stocker la vitamine A et synthétiser la matrice extracellulaire. Ces cellules sont notamment impliquées dans le développement de la fibrose hépatique en réponse à une lésion.

## 2) Les fonctions du foie

### a) Métabolisme des lipides et des lipoprotéines

Les lipides parvenant au foie sont transformés en triglycérides et stockés dans les hépatocytes. En réponse aux besoins énergétiques du corps, ces triglycérides peuvent ensuite être hydrolysés en acides gras et être utilisés. Le foie est également capable de convertir les excès de glucides et de protéines en lipides. Ces derniers seront ensuite exportés et stockés dans les adipocytes. De plus, le foie synthétise de grandes quantités de cholestérol, de triglycérides et de phospholipides. Certains de ces composés sont transportés par l'intermédiaire de lipoprotéines à travers l'organisme (Figure 2). Le reste est excrété dans la bile (Scapa *et al.*, 2007).



**Figure 2. Structure d'une lipoprotéine.**

(*Cholesterol*, cholestérol ; *cholesteryl ester*, ester de cholestérol ; *phospholipid*, phospholipide ; *apolipoprotein*, apolipoprotéine ; *triglyceride*, triglycéride).

### b) Les autres fonctions

Le foie possède un rôle primordial dans l'homéostasie du glucose. Les glucides (glucose, fructose, galactose) sont transformés en glycogène et stockés au sein des hépatocytes. En fonction des besoins de l'organisme, le foie retransforme ensuite ce

glycogène en glucose et le libère dans la circulation sanguine. Si les réserves de glycogène sont épuisées, les hépatocytes peuvent aussi synthétiser du glucose à partir des acides aminés. À partir des protéines et des acides aminés issus de la digestion, les cellules du foie synthétisent la majorité des protéines sanguines notamment l'albumine, toutes les globines, les apolipoprotéines (Apo), les facteurs de coagulation ainsi que les facteurs de croissance. Les hépatocytes possèdent également une activité catabolique permettant la dégradation des protéines ou des peptides issus de la digestion. Ainsi, ces protéines ou peptides sont convertis en glucose ou lipides par l'intermédiaire de réactions de désamination et de transamination. Certaines transaminases (les transaminases ALAT : alanine aminotransférases ou ASAT : aspartate aminotransférases), retrouvées à de fortes concentrations dans le plasma, indiquent des lésions hépatiques.

Certaines substances toxiques pour l'organisme arrivent au foie qui va les dégrader en produits non toxiques. Les produits liposolubles issus de cette dégradation sont ensuite reversés dans la bile, puis dans l'intestin et éliminés dans les selles. Quant aux produits hydrosolubles qui en sont issus, ils sont reversés dans le sang qui les mène jusqu'aux reins où ils seront éliminés par les urines.

Enfin, le foie peut également stocker du fer et des vitamines et peut réguler de nombreuses hormones.

### 3) L'Hépatite virale

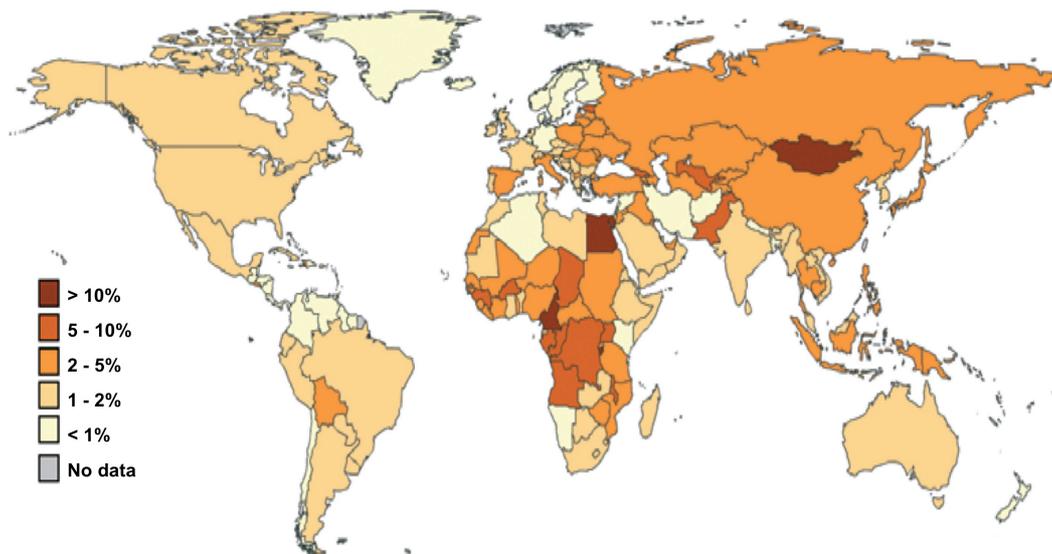
Une hépatite virale est définie comme étant un processus inflammatoire du foie lié à un virus. Actuellement, cinq virus sont connus comme étant les agents étiologiques d'une hépatite : les virus des hépatites A à E (*hepatitis A virus* (HAV), *hepatitis B virus* (HBV), *hepatitis C virus* (HCV), *hepatitis D virus* (HDV) et *hepatitis E virus* (HEV)). Afin d'identifier lequel de ces virus est l'agent causal d'une hépatite, des tests sérologiques sont nécessaires. En effet, bien qu'appartenant à des familles différentes (d'un point de vue classification), tous ces virus induisent une hépatite aiguë. Mais, seuls les virus des hépatites B, C et D (HBV, HCV et HDV) induisent une infection chronique pouvant durer de nombreuses années. Toutefois, chez des patients immunodéprimés, de rares cas d'infections chroniques ont déjà été observés pour le HEV (Bihl and Negro, 2009 ; de Niet *et al.*, 2012). Une hépatite chronique peut évoluer vers une cirrhose hépatique et un cancer du foie. D'autres virus entraînent des atteintes hépatiques tels que le virus de la Dengue, le virus Herpès Simplex (*Herpes simplex virus* ou HSV), le Cytomégalovirus et le virus Epstein-Barr.

Mais, l'implication directe de ces virus dans une hépatite virale reste encore à déterminer. En effet, il semblerait que ces virus ne soient que des virus opportunistes.

## B. L'Hépatite C

### 1) Distribution géographique

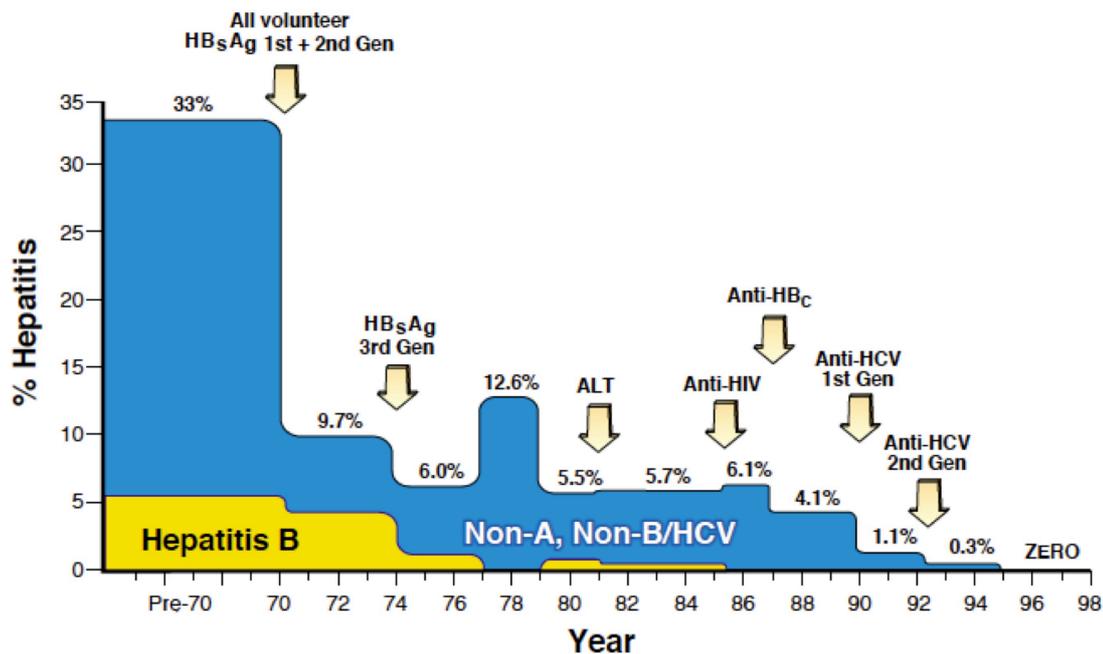
L'infection par le HCV est une cause majeure d'hépatite. Elle est présente à l'échelle mondiale. Selon les dernières données sur la prévalence de l'hépatite C, 2,35% de la population mondiale est chroniquement infectée par ce virus (cent soixante millions de personnes) (Lavanchy, 2011). Cette prévalence varie d'un continent à l'autre (Figure 3). En France, environ 1% de la population est séropositive pour le HCV (Dubois *et al.*, 1997), ce qui correspond à la moyenne Européenne (Touzet *et al.*, 2000). Cependant, dans les pays en voie de développement, cette prévalence demeure plus élevée que dans les pays industrialisés. Par exemple, en Egypte, la prévalence est de 14% (Lavanchy, 2011) à cause de la réutilisation d'aiguilles ou de seringues contaminées pendant les années 1950 à 1980 lors de campagnes anti-bilharziose (Strickland, 2006). Cependant, la prévalence de l'hépatite C reste sous-estimée de part l'absence de données précises (Lavanchy, 2009).



**Figure 3. Prévalence de l'hépatite C dans le monde, en 2010.**  
Adapté de (Lavanchy, 2011).

## 2) Modes de transmission

Le virus de l'hépatite C se transmet essentiellement par voie parentérale (Lemon *et al.*, 2007). Dans les années 1970, le risque de développer une hépatite virale due au HCV, à la suite d'une transfusion était de 30% (Tobler and Busch, 1997 ; Alter and Houghton, 2000). Jusqu'en 1990, la transfusion sanguine représentait la plupart des cas de transmission (Figure 4). Mais, la mise en place de différentes mesures préventives telles que l'inactivation des produits sanguins (à partir de 1987), l'éviction des donneurs de sang à risque (1988) ou encore le dépistage systématique des dons (après 1990) ont permis de réduire ce risque (Roudot-Thoraval, 2002). L'incidence des hépatites virales C, suite à une transfusion ou une transplantation, a ainsi fortement diminué dans les pays développés (Tobler and Busch, 1997). La situation est différente dans les pays en voie de développement. En effet, pour ces pays, la transfusion sanguine reste une cause majeure de transmission du HCV du fait de l'absence de moyens matériels et de pratiques chirurgicales réalisées dans de mauvaises conditions d'asepsie.



**Figure 4. Évolution de l'incidence des hépatites virales suite à une transfusion sanguine.**

Ce graphique retrace l'incidence des hépatites virales suite à une transfusion sanguine, aux États-Unis, de 1969 à 1998. Les flèches indiquent les principales interventions (élimination des dons rémunérés, détection des virus HBV, HIV et HCV et des ALAT (ALT) par différents tests) concernant le dépistage et l'éviction des produits sanguins à risque.

D'après (Alter and Houghton, 2000).

De nos jours, dans les pays développés, le risque majeur de contamination est lié au partage de seringues ou autres matériels. Ce risque est notamment observé dans les populations toxicomanes. En Europe, en 2002, l'estimation des populations toxicomanes séropositives pour HCV était comprise entre 30 et 98% (Roy *et al.*, 2002). De rares cas de transmissions verticales et sexuelles ont été rapportés (Lavanchy, 2009). Les contaminations nosocomiales ou professionnelles sont possibles mais restent difficiles à évaluer. Le tatouage, le piercing ou l'acupuncture constituent une nouvelle source de contamination. Cependant, dans 20% des cas, le mode de contamination demeure inconnu.

### **3) Pathologie et évolution de la maladie**

L'hépatite C est une maladie à long terme. Son évolution est lente et progressive (Figure 5). Dans 80% des cas, l'hépatite aigüe évolue vers la chronicité. En absence de traitement, cette chronicité peut ensuite évoluer en cirrhose hépatique voire en carcinome hépatocellulaire.

#### ***a) L'hépatite C aigüe***

L'infection par le HCV est souvent asymptomatique (Hoofnagle, 2002). Des symptômes tels que, fatigue, nausée, douleurs, fièvre, anorexie, urine sombre et ictère, apparaissent chez 30% des patients, de trois à douze semaines après la première exposition. Deux à trois semaines après contamination, l'ARN viral est détectable dans le sérum. Puis, quatre semaines post-infection, la concentration sérique en transaminases (ALAT et ASAT) augmente de manière transitoire. La séroconversion intervient sous deux à huit semaines après exposition. Quatre-vingts pour cent des individus infectés développeront une infection chronique. Les cas d'hépatite fulminante sont rares (Farci *et al.*, 1996b). La guérison de l'infection aigüe est faible (environ 20%) et est caractérisée par l'absence durable de l'ARN viral dans le sang.

#### ***b) L'hépatite C chronique***

Le passage à la chronicité est caractérisé par la persistance du virus plus de six mois après l'infection (Barrera *et al.*, 1995). Pour 80% des personnes infectées par le HCV, l'ARN viral peut être mis en évidence dans le sérum de manière durable. La présence de ce dernier traduit le développement d'une virémie persistante. Le risque de développer une hépatite chronique est influencé par divers facteurs tels que, l'âge, le sexe (le risque est plus élevé pour le sexe masculin comparativement au sexe féminin), l'obésité, le fait d'être co-infecté par le

virus de l'immunodéficience humaine (*human immunodeficiency virus* ou HIV) ou par le HBV (Vaquer *et al.*, 1994). De plus, la consommation d'alcool influence la progression de la maladie. De même que pour l'hépatite aigüe, les symptômes associés à cette forme d'hépatite ne sont pas distinctifs. Cependant, les individus chroniquement infectés peuvent également développer des formes plus sévères de la maladie. En effet, une stéatose (une accumulation de triglycérides dans le foie) (Yoon and Hu, 2006), une fibrose (une accumulation de matrice extracellulaire dans le foie en réponse à un environnement inflammatoire constant) et un carcinome hépatocellulaire (Levrero, 2006) peuvent être observés chez ces personnes. L'évolution de la maladie est lente (Yano *et al.*, 1996). Environ 20% des patients chroniquement infectés évolueront vers une cirrhose dans les vingt ans suivant l'infection (Hoofnagle, 2002) avec, pour 1 à 4% d'entre eux, le risque de développer un carcinome hépatocellulaire, par an.

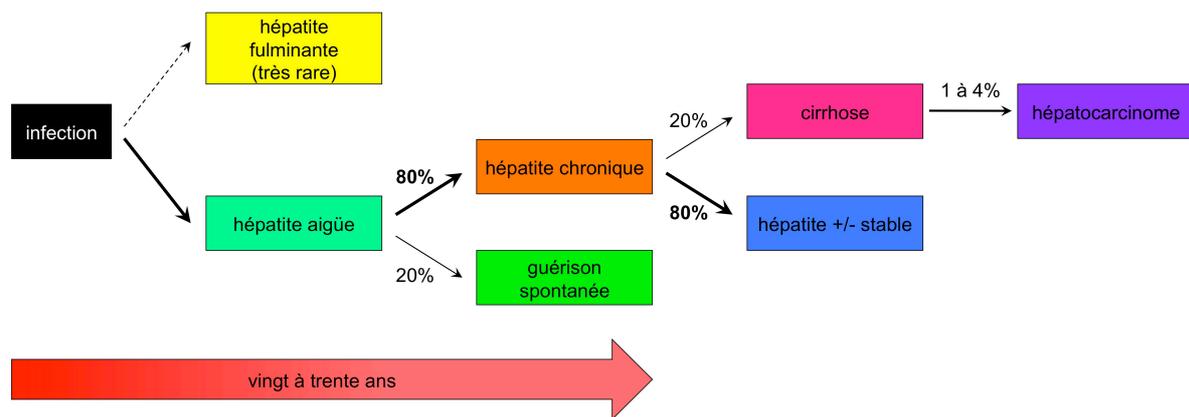


Figure 5. Évolution d'une hépatite causée par le HCV.

#### 4) Diagnostic de l'hépatite C

Les symptômes associés à la phase aigüe de l'hépatite virale C étant peu caractéristiques, la plupart des individus infectés ne savent pas qu'ils sont contaminés. De ce fait, ils ne consultent pas de médecin. Différentes méthodes sont utilisées pour diagnostiquer une hépatite. Le foie peut être palpé, une échographie abdominale, un fibroscan ou une biopsie hépatique peuvent être réalisés par observation directe de l'organe ou prélèvement d'une partie du foie. Cependant, une hépatite peut également être diagnostiquée de manière indirecte par titration des transaminases ou des marqueurs de fibrose à partir du sérum d'un patient.

Le diagnostic d'une hépatite C est nécessaire lors :

- (1) d'une suspicion de contamination par le HCV (comme par exemple dans le cas d'une infirmière qui se pique avec une aiguille ayant servi pour un patient séropositif pour le HCV) ou pour les patients présentant des symptômes similaires à ceux décrits pour une hépatite C
- (2) du dépistage des dons de sang et des dons d'organes
- (3) du suivi de patients infectés afin d'adapter au mieux le traitement.

#### ***a) Le premier test diagnostique pour l'hépatite C***

Pour le HCV, le premier test diagnostique, un test ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) a été développé par l'équipe du Dr Michael Houghton à Chiron (États-Unis). Cette découverte a été possible suite à la découverte du HCV et à l'identification du premier antigène viral associé à l'hépatite C (Choo *et al.*, 1989) (voir partie II.A.). Cet antigène était capable de réagir avec les anticorps présents dans le sérum de patients infectés (Kuo *et al.*, 1989). C'est ainsi qu'en 1990, le dépistage universel des dons pour le HCV est instauré et que, par conséquent, le pourcentage d'hépatites diminue fortement (70 à 1,5%). Ceci a permis de mettre en évidence le fait que le HCV était l'agent causal responsable des cas d'hépatites non-A non-B dans le monde.

De nos jours, les marqueurs viraux servant à diagnostiquer une infection par le HCV sont : la quantification de l'ARN ou de l'antigène de capsid core (ce sont des marqueurs de la réplication du virus), les anticorps anti-HCV et le génotypage (qui correspond à la détermination du génotype viral). Tous ces éléments constituent les marqueurs d'une infection passée ou présente.

#### ***b) Diagnostic indirect de l'infection par le HCV***

Le diagnostic indirect de l'infection par le HCV repose sur la détection d'anticorps anti-HCV spécifiques présents dans le sérum d'un patient. Cette méthode constitue la méthode de prédilection pour les tests de dépistage. Les anticorps sont détectables de deux à huit semaines après infection et persistent en cas de chronicité. Le principal test utilisé de nos jours pour détecter les anticorps anti-HCV est le test ELISA (Chevaliez and Pawlotsky, 2006 ; Chevaliez and Pawlotsky 2007 ; Chevaliez and Pawlotsky 2009).

#### ***c) Diagnostic direct de l'infection par le HCV***

Ce diagnostic repose sur l'amplification de l'ARN viral ou sur la détection de l'antigène de capsid core. L'ARN viral est détectable soixante jours après l'infection. C'est

le premier marqueur détectable après l'infection (Pawlotsky, 2002). Il peut être amplifié par RT-PCR (*reverse transcription-polymerase chain reaction*) et TMA (*transcription mediated amplification*) qui sont deux méthodes de détection qualitative de l'ARN. Pour la première, ce sont les copies d'ADN double brin générées qui sont détectées, alors que pour la seconde, ce sont les copies d'ARN simple brin. De nombreuses autres méthodes de détection quantitatives ont également été décrites. Elles permettent l'amplification de la cible (RT-PCR ou PCR compétitive) ou d'un signal (*branched DNA assay*).

L'antigène de capsid core peut être détecté par ELISA, huit à neuf semaines après infection. De plus, les niveaux d'antigène de la protéine core sont corrélés avec le niveau d'ARN (Pawlotsky, 2002).

#### ***d) Détermination du génotype viral***

Il est important de déterminer le génotype viral associé à une hépatite C avant le début d'un traitement. En effet, le génotype va donner une indication sur le traitement à administrer, la durée du traitement, ainsi que la dose de ribavirine (Chevaliez and Pawlotsky, 2007). Le génotype viral peut être déterminé directement par séquençage ou hybridation inverse en utilisant des sondes spécifiques du génotype. Ces sondes correspondent aux séquences de la protéine virale NS5B ou de la glycoprotéine d'enveloppe E1 ou encore à la région 5' non codante de l'ARN viral. Cette technique est appelée détermination moléculaire ou génotypage par PCR.

Le génotype peut également être déterminé de manière indirecte par ELISA en utilisant des antigènes spécifiques du génotype (Chevaliez and Pawlotsky, 2009). Cette technique est alors appelée détermination sérologique ou encore sérotypage (Pawlotsky, 2002). Cependant, le test ELISA ne permet pas de déterminer le sous-génotype viral.

Toutefois, la détermination du génotype et surtout celle du sous-type viral vont être importantes en ce qui concerne l'identification des différentes substitutions en acides aminés pouvant conférer une résistance aux différents inhibiteurs viraux.

### **5) Réponse immunitaire au cours de l'infection par le virus de l'hépatite C**

En réponse à une infection virale, les cellules infectées produisent différents types d'interférons (IFN) ainsi que de nombreuses autres cytokines. Par la suite, ces médiateurs chimiques vont stimuler les différents acteurs de la réponse immunitaire innée et de la réponse immunitaire adaptative de l'hôte. Ces deux réponses sont essentielles afin de contrôler

l'infection par le HCV. Ainsi, la chronicité de l'infection par le HCV semble liée à l'instauration d'un équilibre entre le niveau de réplication virale et la réponse immunitaire de l'hôte.

#### **a) Réponse immunitaire innée**

À la suite d'une infection virale, l'hôte mobilise la réponse immunitaire innée, son premier système de défense, afin d'éliminer l'agent infectieux. Ainsi, en réponse à l'infection par le HCV, les hépatocytes produisent de l'IFN- $\beta$ . En bref, des motifs moléculaires appelés PAMP (pour *pathogen-associated molecular patterns*) conservés parmi les pathogènes et associés au HCV, vont être reconnus par des récepteurs cellulaires (encore appelés PRR pour *pathogen-recognition receptors*). Dans le cas d'une infection par le HCV, le récepteur TLR-3 (*toll-like receptor 3*) reconnaît la présence d'ARN double brin extracellulaire au niveau des endosomes. De même, les régions structurées en 5' et 3' de l'ARN génomique du HCV sont reconnues au niveau du cytosol par des ARN hélicases telles que RIG-I (*retinoic acid-inducible gene-I*) et MDA-5 (*melanoma differentiation-associated antigen 5*). Suite à cette reconnaissance, de nombreuses cascades de signalisation intracellulaire sont activées (Sumpter *et al.*, 2005 ; Saito *et al.*, 2008 ; Wang *et al.*, 2009) ce qui conduit à la production d'IFN- $\beta$ . Cet IFN va ensuite se fixer sur les récepteurs à l'interféron (IFNAR ou *interferon-alpha/beta receptors*) présents à la surface cellulaire. Il s'en suit alors une activation de la voie de signalisation JAK/STAT (*janus kinase/signal transducers and activators of transcription*). Cette dernière induit l'expression de nombreux gènes : les gènes stimulés par l'interféron ou ISG (pour *interferon-stimulated genes*) dont le gène codant pour la 2'-5' oligo-adénylate synthétase (2'-5' OAS), le gène codant pour la protéine kinase R (PKR), ainsi que d'autres cytokines. Enfin, les cytokines produites, déclenchent un état antiviral dans les cellules infectées et les cellules non infectées (Bigger *et al.*, 2001 ; Feld and Hoofnagle, 2005).

Le virus de l'hépatite C a élaboré diverses stratégies afin de perturber ces voies de signalisation. En effet, la protéase virale NS3/4A, en clivant les protéines cellulaires nécessaires à la transduction du signal CARDIF (ou IPS-I (*interferon- $\beta$  promoter stimulator-I*) ou MAVS (*mitochondrial antiviral signaling protein*) ou VISA (*virus-induced-signaling adapter*)) et TRIF (*toll/interleukin-I receptor-domain-containing adapter inducing interferon- $\beta$* ), bloque les voies de signalisation dépendantes du TLR-3 et de RIG-I (Meylan *et al.*, 2005 ; Li *et al.*, 2005a ; Li *et al.*, 2005b). Ces molécules étant

impliquées dans la voie de production de l'IFN- $\beta$ , il en résulte une diminution de la production de ce dernier. De plus, le HCV a également développé d'autres stratégies afin d'interférer avec la sécrétion des IFN de type I (IFN- $\alpha$  et IFN- $\beta$ ). Par exemple, la protéine de capsid, core, bloque l'induction des ISG en interagissant avec la protéine STAT1 (Bode *et al.*, 2003 ; Lin *et al.*, 2006). De plus, la protéine de capsid, la glycoprotéine d'enveloppe E2 et la protéine non structurale NS5A, quant à elles, modulent certaines voies de signalisation et bloquent la fonction de ces ISG (Pflugheber *et al.*, 2002 ; Hosui *et al.*, 2003 ; pour revue Rehmann, 2009).

Les cellules Natural Killer (NK), rapidement activées par stimulation cytokinique (Cheent and Khakoo, 2011) agissent de manière directe en ciblant les hépatocytes infectés (ils présentent un défaut d'expression du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (*major histocompatibility complex class-I* ou MHC-I). La présence de facteurs génétiques régulant le niveau de sensibilité des cellules NK est corrélée avec la clairance du HCV (Khakoo *et al.*, 2004). Cependant, la capacité du HCV à interférer avec la fonction des cellules NK reste controversée (Yoon *et al.*, 2009). Par conséquent, les cellules NK jouent un rôle important dans la clairance du HCV de par leurs fonctions cytotoxiques et leur implication dans la production de cytokines.

Les diverses cytokines produites au cours de la réponse immunitaire innée, vont également activer les cellules présentatrices de l'antigène (*antigen presenting cells* ou APC). Les cellules dendritiques (DC), qui sont des APC, vont, à leur tour, activer les différents acteurs de la réponse immunitaire adaptative. Ces cellules sont les seules APC capables d'induire une réponse cytotoxique faisant intervenir les lymphocytes T ( $L_T$ )  $CD8^+$ . Par conséquent, les DC représentent les acteurs cellulaires au carrefour de la réponse immunitaire innée et de la réponse immunitaire adaptative. Ces cellules peuvent être permissives à l'infection par le HCV. Cependant, il semble que la traduction et la réplication du génome viral dans ces dernières soient faibles. Enfin, le virus semble altérer les fonctions de présentation de l'antigène de ces cellules, ce qui conduirait à une mauvaise qualité des réponses T  $CD4^+$  et T  $CD8^+$  (Pachiadakis *et al.*, 2005) et ainsi à favoriser la persistance virale.

### ***b) Réponse immunitaire adaptative***

Dans les phases tardives de l'infection, une réponse spécifique, dirigée contre le HCV est mise en place. Les hépatocytes infectés par le virus sont attaqués par les lymphocytes T cytotoxiques (CTL). De plus, les anticorps neutralisants produits par les lymphocytes B ( $L_B$ ) reconnaissent et inactivent le virus circulant dans le sérum. Cette réponse immunitaire se met

en place au bout de plusieurs semaines. Ceci s'explique par le fait que son activation dépend de la réponse immunitaire innée.

### **i - Réponse immunitaire adaptative cellulaire**

La réponse immunitaire adaptative cellulaire dirigée contre le HCV, est stimulée par les DC qui migrent dans les ganglions lymphatiques pour présenter les antigènes viraux aux  $L_T$  naïfs. Ces derniers, après une stimulation croisée, se différencient en  $L_T$  Th1 (*T helper 1*) ( $CD4^+$ ). Ensuite, ces lymphocytes sécrètent de l'interleukine-2 (IL-2) et de l'IFN- $\gamma$  induisant ainsi l'activation et la prolifération des CTL ( $CD8^+$ ) mais aussi des cellules NK. Les CTL reconnaissent les antigènes du HCV sur les DC. Suite à leur maturation, ces cellules quittent les ganglions lymphatiques et induisent une réponse cytotoxique afin d'éliminer les hépatocytes infectés (Hiroishi *et al.*, 2008). L'interféron- $\gamma$  sécrété par ces cellules contribue également à l'élimination virale (Lechner *et al.*, 2000).

Au cours de l'infection aiguë, la réponse T  $CD4^+$  est détectable dans le sang périphérique trois à quatre semaines après contamination. Une corrélation forte entre cette réponse et la clairance virale semble exister au cours de l'infection aiguë (Rosen *et al.*, 2002). L'élimination du virus est associée à une réponse lymphocytaire T  $CD4^+$  rapide, forte, soutenue et semblant persister pendant plusieurs années (Takaki *et al.*, 2000). Cependant, chez les patients chroniquement infectés, la réponse est plus faible, retardée voire transitoire (Gerlach *et al.*, 1999). La réponse T  $CD4^+$  est principalement dirigée contre les protéines non structurales du HCV (Hoffmann *et al.*, 1995 ; Rosen *et al.*, 2002), en particulier la protéine NS3 qui est très immunogène.

L'intervalle de temps entre la contamination par le HCV et la détection d'une réponse T  $CD8^+$  est variable. Plusieurs études ont suggéré un dysfonctionnement des cellules T  $CD8^+$  au cours de l'infection. En effet, il semble que ces cellules présentent un défaut dans leur capacité à proliférer, à sécréter des cytokines et à exercer leur fonction cytotoxique (Neumann-Haefelin *et al.*, 2005). De plus, par des mécanismes cytolitiques mais aussi non cytolitiques (par exemple, via la production d'IFN- $\gamma$ ), il semble que la réponse immunitaire  $CD8^+$  contribue à la clairance virale (Thimme *et al.*, 2001). Les patients éliminant le virus pendant la phase aiguë de l'infection présentent généralement une réponse lymphocytaire T  $CD8^+$  très forte et multi-spécifique (Grüner *et al.*, 2000). Les épitopes viraux ciblés conditionnent en partie l'échappement viral (Ward *et al.*, 2002). En effet, une réponse dirigée contre certains épitopes des protéines virales NS3 et NS5B semble favoriser la clairance virale ainsi qu'une réponse immunitaire soutenue. Néanmoins, au cours de l'infection

chronique, il semble qu'un équilibre se crée entre l'intensité de la réponse lymphocytaire T CD8<sup>+</sup> spécifique et la réplication virale (Lancaster *et al.*, 2002).

Pour conclure, la réponse immunitaire cellulaire joue un rôle important dans l'évolution de l'infection par le HCV. Toutefois, la contribution relative des L<sub>T</sub> CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> dans la clairance virale n'est pas complètement élucidée. Cependant, ces deux populations semblent essentielles (Figure 6).

## ii - Réponse immunitaire adaptative humorale

Pendant l'infection, de nombreux anticorps dirigés contre le HCV sont produits. Cependant, la majorité d'entre eux ne possèdent pas d'activité antivirale à proprement dite. En effet, ces anticorps sont soit produits à partir de protéines intracellulaires, non structurales ou non fonctionnelles provenant du relargage de cellules mortes, soit ils sont dirigés contre des épitopes n'étant pas impliqués dans le processus d'entrée virale. Toutefois, certains de ces anticorps sont neutralisants puisqu'ils empêchent ou contrôlent l'infection virale. La découverte de certains d'entre eux a été possible grâce au développement des particules rétrovirales pseudotypées (*HCV pseudoparticles* ou HCVpp) (voir partie II.C.2.c.) (Bartosch *et al.*, 2003c ; Bartosch *et al.*, 2003b ; Lavillette *et al.*, 2005a). De plus, l'activité neutralisante de certains anticorps monoclonaux et polyclonaux a également été montrée en utilisant les modèles des souris humanisées ou transgéniques (Law *et al.*, 2008 ; Vanwolleghem *et al.*, 2008 ; Meuleman *et al.*, 2011a ; Giang *et al.*, 2012).

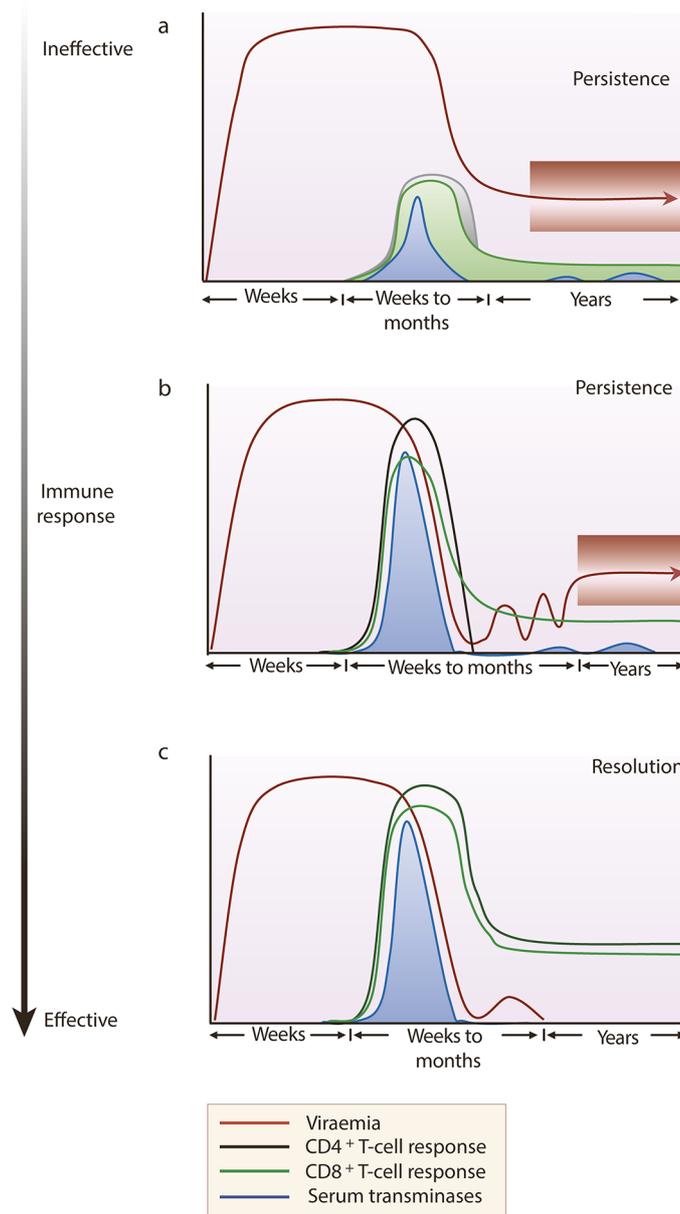
Les anticorps spécifiques du virus sont détectés huit à vingt semaines après l'infection (Rehermann, 2009). Leur rôle protecteur dans l'infection du HCV est controversé. En effet, dans certains cas, ces anticorps ne semblent pas nécessaires pour la résolution de l'infection (Cooper *et al.*, 1999 ; Post *et al.*, 2004). Dans d'autres cas, ces anticorps sont incapables d'empêcher une ré-infection chez le chimpanzé ou chez l'homme (Farci *et al.*, 1992 ; Lai *et al.*, 1994). Cependant, un traitement *in vitro* du virus avec ces anticorps neutralisants inhibe son infectivité chez le chimpanzé (Farci *et al.*, 1994). Ainsi, il semblerait que la capacité du HCV à coexister avec les anticorps neutralisants présents chez les patients chroniquement infectés puisse s'expliquer par l'existence d'anticorps non neutralisants qui inhiberaient les anticorps neutralisants (Zhang *et al.*, 2007 ; Zhang *et al.*, 2009). De plus, des études suggèrent que la clairance virale est associée à une induction efficace de la production d'anticorps neutralisants au cours de la phase précoce de l'infection (Lavillette *et al.*, 2005b ; Pestka *et al.*, 2007). De même, une faible diversité génétique du virus pendant la phase aigüe de l'infection indiquerait une résolution de l'infection (Farci *et al.*, 2000). De

manière intéressante, les anticorps neutralisants peuvent réduire la ré-infection de patients après une transplantation hépatique (Féray *et al.*, 1998).

Généralement, les anticorps neutralisants reconnaissent des épitopes présents sur les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 exposées à la surface des virions. Il semble que l'immunogénicité de ces dernières dépende de leur niveau de glycosylation (Helle *et al.*, 2007). Ces anticorps neutralisants interfèrent avec les interactions entre les glycoprotéines E1 et E2 et les récepteurs cellulaires ou en bloquant des étapes post-entrée comme le processus de fusion (Haberstroh *et al.*, 2008). De plus, les anticorps générés contre la région HVR1 (*hypervariable region 1*) de E2 corrélient avec la progression de la maladie. Cependant, malgré leur présence, l'évolution chronique de la maladie ne peut être empêchée. Ceci peut être expliqué comme suit. La pression de sélection exercée par le système immunitaire induit la génération de variants d'échappement (von Hahn *et al.*, 2007). Ces nouveaux variants ne sont alors plus reconnus par les anticorps circulants. Ainsi, lorsque de nouveaux anticorps neutralisants sont générés, d'autres quasi-espèces apparaissent : elles échappent à la neutralisation. Par conséquent, même si la région HVR1 de la glycoprotéine d'enveloppe E2 semble particulièrement immunogène, les anticorps ciblant cette région ne sont généralement spécifiques que d'un nombre limité d'isolats (Farci *et al.*, 1996a). D'autres études décrivent des anticorps neutralisants avec une activité à large spectre, prouvant qu'il existe aussi des épitopes neutralisants situés hors de HVR1 (Meunier *et al.*, 2005 ; Keck *et al.*, 2007 ; Wang *et al.*, 2011). En effet, chez les patients chroniquement infectés, des anticorps dirigés contre les protéines structurales et non structurales du virus sont retrouvés (Bartosch *et al.*, 2003c ; Logvinoff *et al.*, 2004 ; Lavillette *et al.*, 2005a).

### iii - Mémoire immunitaire

La mémoire immunitaire est octroyée au cours d'une résolution spontanée d'une hépatite C aigüe. Cependant, elle ne protège pas en cas de ré-infection (Farci *et al.*, 1992 ; Lai *et al.*, 1994). Néanmoins, cette dernière réduit le risque de persistance virale suite à une ré-exposition (Mehta *et al.*, 2002). En effet, dans une cohorte de patients infectés par le HCV, la majorité des personnes ayant résolu l'infection possédaient une forte réponse immunitaire T spécifique. Toutefois, leur réponse sérologique était perdue dix-huit ans plus tard (Takaki *et al.*, 2000).



**Figure 6. Représentation schématique de la réponse immunitaire cellulaire au cours de l'infection par le HCV.**

La virémie (courbe rouge) augmente rapidement et diminue avec la mise en place des réponses T CD4<sup>+</sup> (courbe noire) et CD8<sup>+</sup> (courbe verte). Les courbes pleines indiquent que les réponses peuvent être variables en fonction des patients. Des réponses immunitaires cellulaires faibles (a) ou ne durant pas dans le temps (b) sont associées à une virémie persistante et peuvent évoluer vers la chronicité. Même dans le cas d'une virémie chronique, une réponse T CD8<sup>+</sup> peut être détectée et peut persister (a, b). (c) Bien que la virémie apparaisse rapidement et que les réponses cellulaires apparaissent tardivement, le virus devient indétectable dans le plasma après l'apparition des réponses T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>. Une remontée de la virémie peut avoir lieu avant la clairance virale.

(a, b, c) Les dommages hépatiques, évalués par l'élévation des transaminases sériques, sont variables mais coïncident généralement avec la présence d'une réponse immunitaire de type T.

D'après (Bowen and Walker, 2005).

### ***c) Réponse immunitaire et progression de la maladie***

La réponse immunitaire dirigée contre le HCV serait la cause principale de lésion hépatique associée à l'hépatite C (Rehermann, 2009). Cependant, pendant l'infection aiguë, l'altération du foie, reflétée par une augmentation des niveaux sériques de transaminases, corrèle avec l'infiltration des  $L_T$  dans le foie. Elle résulte probablement de l'expansion et de l'activation simultanées des CTL spécifiques du HCV. De plus, les cellules hépatiques étoilées activées par les cytokines inflammatoires, sécrètent de manière abondante de la matrice extracellulaire, parvenant à la fibrose et à la cirrhose. Enfin, les manifestations cliniques de l'infection aiguë (par exemple : fièvre, maux de tête, myalgie et anorexie) résultent des médiateurs de l'inflammation (comme les cytokines).

Certaines infections aiguës se résolvent de manière spontanée, sans augmentation des transaminases sériques et s'expliqueraient par un contrôle non cytolytique de l'infection. De plus, chez les patients immunodéficients et immunodéprimés, un foie lésé est observé, indiquant que d'autres facteurs (probablement des facteurs viraux) pourraient jouer un rôle dans la pathogenèse associée à l'hépatite C (Fischer *et al.*, 2007). Régulièrement, des effets cytopathogènes sont observés en culture cellulaire avec des cellules infectées avec la souche JFH-1 (*japanese fulminant hepatitis-isolate 1*) du HCV (Walters *et al.*, 2009).

Actuellement, la réponse immunitaire dirigée au cours de l'infection par le HCV n'est pas entièrement comprise. Ceci s'explique notamment par le fait que les différents acteurs de l'immunité antivirale innée et adaptative sont étroitement liés.

## **6) Les thérapies**

Jusque récemment, le traitement standard utilisé dans le cadre d'une hépatite C consistait en une combinaison d'IFN alpha pégylé (PEG-IFN- $\alpha$ ) et de ribavirine (RBV). Cependant, avec la récente mise sur le marché de deux nouvelles molécules, le télaprévir et le bocéprévir, la posologie de ce dernier a quelque peu été reconsidérée. Ces deux inhibiteurs de la protéase virale NS3/4A ciblent directement la protéase du virus et induisent une exacerbation de la réponse virologique soutenue (SVR), notamment contre le génotype 1 du HCV. Une réponse virologique soutenue est définie par la non détection de l'ARN viral dans le sang, vingt-quatre semaines après arrêt du traitement. Ce stade clinique est généralement associé à une régression de la fibrose, à un risque moindre de carcinome hépatocellulaire et à une morbidité et une mortalité réduites. Ainsi, l'utilisation de l'une de ces molécules ouvre de nouvelles perspectives concernant le traitement anti-HCV. Toutefois, malgré des résultats prometteurs, cette trithérapie n'est pas transposable chez tous les patients infectés. En effet,

dans le cas d'un stade avancé de cirrhose, le seul recours est la transplantation hépatique. Enfin, puisque aucun vaccin n'est disponible contre l'hépatite C, la prévention de l'infection repose uniquement sur la réduction ou l'élimination des risques de transmission.

#### **a) De la bithérapie ...**

Actuellement, l'hépatite C est la seule infection virale chronique pouvant être éradiquée à l'aide d'antiviraux. La bithérapie, constituée d'une combinaison de PEG-IFN- $\alpha$  et de RBV, résulte de nombreuses années de recherche (Davis and Lindsay, 2005).

#### **i - L'interféron**

Dans les années 1970-1980, une diminution de la production d'IFN endogène a été observée chez les patients chroniquement infectés par le HCV. Pour la première fois, en 1984, l'IFN- $\alpha$  est utilisé en monothérapie (en une prise quotidienne) (Hoofnagle *et al.*, 1986). L'IFN- $\alpha$  agit de manière similaire aux IFN endogènes (Feld and Hoofnagle, 2005) en activant l'expression de centaines de gènes impliqués dans le déclenchement d'une réponse immunitaire innée contre le HCV (voir partie I.B.5.a.). De plus, l'utilisation de l'IFN conduit à une diminution de la charge virale, à l'induction d'un état antiviral dans les cellules non infectées, à une augmentation de la lyse des cellules infectées et à une inhibition de la fibrogenèse hépatique (Feld and Hoofnagle, 2005). Enfin, chez les patients qui ne répondent pas au traitement, une expression constitutive et élevée des ISG est observée. Par conséquent, chez ces patients, les ISG ne peuvent être stimulés davantage par l'apport exogène d'IFN (Sarasin-Filipowicz *et al.*, 2008). À la fin des années 1990, la pégylation de l'IFN- $\alpha$ , a permis de diminuer la posologie de cette molécule. En effet, la conjugaison de l'IFN au polyéthylène glycol (PEG) augmente sa demi-vie plasmatique. Ainsi, une injection hebdomadaire de PEG-IFN suffit à augmenter la tolérance mais aussi la réponse au traitement (Manns *et al.*, 2001 ; Fried *et al.*, 2002). Dans les années 2000, deux nouveaux types d'IFN sont découverts : le PEG-IFN- $\alpha$  2a (Pegasys, Roche) et le PEG-IFN- $\alpha$  2b (PegIntron, Merk) (Fried *et al.*, 2002 ; Davis *et al.*, 2003 ; Ghany *et al.*, 2009). Ces deux IFN ont une posologie différente : la dose de PEG-IFN- $\alpha$  2a est fixe alors que la dose de PEG-IFN- $\alpha$  2b est adaptée en fonction du poids du patient traité. Ces deux types d'IFN diffèrent au niveau de propriétés pharmacocinétiques expliquées par un type de molécule de pégylation différent. Enfin, en décembre 2009, le laboratoire *Human Genome Sciences* (qui est maintenant associé au laboratoire pharmaceutique GlaxoSmithKline (GSK)) a soumis une candidature auprès de

l'agence fédérale américaine des produits alimentaires et médicamenteux (FDA) pour une autorisation de mise sur le marché de l'Albuferon alpha (Zalbin). Cette molécule correspond à la fusion de l'IFN- $\alpha$  avec l'albumine. Elle fait l'objet d'une étude clinique de phase III. Cet IFN est aussi efficace que le PEG-IFN- $\alpha$ . Cependant, il possède une durée de demi-vie plasmatique plus longue et ne nécessite qu'une administration toutes les deux à quatre semaines (Zeuzem *et al.*, 2008 ; Nelson *et al.*, 2010).

De manière générale, l'IFN- $\alpha$  possède une action limitée et provoque de nombreux effets secondaires. Ainsi, de nouvelles recherches sont perpétuellement menées afin de trouver de nouveaux IFN dépourvus des effets négatifs associés à l'IFN- $\alpha$ . Par exemple, l'IFN- $\lambda$ , récemment testé dans le traitement contre l'hépatite C, cible plus spécifiquement les cellules hépatocytaires que l'IFN- $\alpha$  2a, induisant une diminution des effets secondaires (Barth, 2011). De plus, chez des patients infectés avec les génotypes 1 à 4, une diminution des symptômes (état grippal, symptômes musculo-squeletaux et cytopénie) ainsi que l'induction d'une meilleure SVR sont observés (Zeuzem *et al.*, 2011). Enfin, la forme pégylée de cet IFN s'est révélée intéressante pour traiter les patients chroniquement infectés par le génotype 1, avec ou sans RBV (Muir *et al.*, 2010).

## ii - La ribavirine

La ribavirine (1- $\beta$ -D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide) a été synthétisée pour la première fois en 1972 (Witkowski *et al.*, 1972). Cette molécule, un analogue nucléosidique de la guanosine, possède un effet antiviral contre de nombreux virus. De manière générale, la RBV est un agent mutagène qui interfère avec les polymérase virales. L'effet antiviral de la RBV contre le HCV n'est pas très bien expliqué. Il pourrait résulter d'une synergie entre différents mécanismes. Tout d'abord, une inhibition directe de la réplication du HCV. En effet, du fait de son analogie avec la guanosine, l'incorporation de la RBV pourrait bloquer l'étape d'élongation lors de la traduction. Une autre hypothèse suggère que la RBV, en inhibant une enzyme de l'hôte, l'inosine monophosphate déhydrogénase (IMPDH), interfère avec la synthèse de la guanosine triphosphate (GTP), nécessaire à la polymérase virale et donc à la réplication virale (Markland *et al.*, 2000). Enfin, l'incorporation de la RBV dans l'ARN peut induire une mutagenèse létale, un phénomène appelé « erreur catastrophe ». Ce phénomène correspond à une accumulation excessive de mutations induisant un effondrement de la virulence (Crotty *et al.*, 2000 ; Vo *et al.*, 2003). De plus, la RBV semble moduler de manière indirecte la réponse immunitaire de l'hôte afin

d'éradiquer le HCV (Tam *et al.*, 1999 ; Thomas *et al.*, 2011). Lorsqu'elle est prise en monothérapie, la RBV ne diminue pas les titres viraux du HCV (Dusheiko *et al.*, 1996 ; Bodenheimer *et al.*, 1997) mais induit une baisse significative des transaminases sériques (Feld and Hoofnagle, 2005). Ainsi, pour le traitement du HCV, cette molécule n'est significativement efficace que lorsqu'elle est utilisée en combinaison avec le PEG-IFN- $\alpha$  (Pawlotsky *et al.*, 2004).

De manière générale, l'administration de la RBV provoque une anémie hémolytique. Par conséquent, d'autres molécules sont en cours d'étude. Par exemple, la viramidine (ou taribavirine), un précurseur de la RBV en cours d'étude clinique de phase III, possède la même activité antivirale contre le HCV mais sans l'effet hémolytique (Kearney *et al.*, 2008 ; Marcellin *et al.*, 2010).

### iii - Les résultats obtenus avec la bithérapie ...

Les deux avancées majeures qui ont conduit à la bithérapie, encore utilisée depuis peu contre l'hépatite C, sont la pégylation de l'IFN- $\alpha$  et l'addition de RBV. En effet cette combinaison a augmenté la réponse antivirale en réduisant la rechute après traitement (Chemello *et al.*, 1995). En effet, la SVR est de 15 à 20% dans le cas d'une monothérapie avec de l'IFN- $\alpha$ , alors que pour la combinaison IFN- $\alpha$  et RBV, elle est de 35% (McHutchison *et al.*, 1998 ; Poynard *et al.*, 1998).

Généralement, chez les patients chroniquement infectés, le temps de traitement est adapté en fonction du génotype viral. Il est de quarante-huit semaines pour les génotypes 1, 4, 5 et 6 contre vingt-quatre semaines pour les génotypes 2 et 3 (Di Bisceglie and Hoofnagle, 2002 ; Shiffman *et al.*, 2007). Une réponse virologique soutenue est obtenue chez 80% des patients infectés avec les génotypes 2 et 3 alors qu'elle est inférieure à 50% chez les patients infectés avec le génotype 1 (Davis and Lindsay, 2005 ; Zeuzem, 2008 ; Kramer *et al.*, 2012).

Pour conclure, ce traitement est très coûteux. Il est également associé à de nombreux effets secondaires tels que, fièvre, myalgie, maux de tête, anémie hémolytique et dépression sévère. De plus, malgré l'administration de facteurs de croissance afin de contrer certains de ces effets secondaires, l'efficacité limitée, la durée et l'importance de ces effets secondaires sont à l'origine de nombreux arrêts du traitement ainsi que de nombreuses contre-indications. C'est pourquoi la connaissance de facteurs pouvant prédire la réponse au traitement est maintenant largement souhaitée.

#### **iv - Le polymorphisme du gène *IL-28B* : une découverte majeure de l'année 2009**

Un polymorphisme unique (*single nucleotide polymorphism* ou SNP), rs12979860, codé par le chromosome 19, a été découvert à proximité du gène *IL-28B* (interleukine-28B) qui code l'IFN- $\lambda$ 3. Ce polymorphisme prédit la réponse au traitement (Ge *et al.*, 2009 ; Suppiah *et al.*, 2009 ; Tanaka *et al.*, 2009). En effet, au sein d'une cohorte de patients ayant reçus une combinaison de PEG-IFN- $\alpha$  et de RBV, 78% des individus avec le génotype CC, 38% des individus avec le génotype TC et 26% des individus avec le génotype TT présentent une SVR (Ge *et al.*, 2009). De plus, l'allèle rs12979860 C/C est fortement associée à une clairance virale spontanée (Thomas *et al.*, 2009). De même, il semble que ce polymorphisme diffère selon l'appartenance ethnique. En effet, les Asiatiques et les Caucasiens, chez qui la prédominance de l'allèle C est la plus forte, répondent avec les taux de SVR les plus forts. En revanche, les Africains, chez qui l'allèle T prédomine, présentent des taux de SVR plus faibles. De plus, les statuts de ce SNP chez le donneur du greffon et le receveur corrélerent avec la réapparition du HCV (Charlton *et al.*, 2011). Par conséquent, le génotypage du gène *IL-28B* chez les patients peut donner des informations supplémentaires concernant le déroulement naturel de l'infection par le HCV. Par conséquent, il est possible de prédire l'issue du traitement. Ainsi, chez les patients pouvant contrôler naturellement l'infection ou pour lesquels la SVR serait faible, la bithérapie est à proscrire. En résumé, le polymorphisme du gène *IL-28B* est l'un des déterminants le plus prédictif de la SVR.

Dans tous les cas, la décision clinique de traiter l'hépatite C dépend de la considération profonde des propriétés du virus et de l'hôte. Ainsi, les nouveaux défis pour le traitement contre le HCV impliquent de trouver de nouvelles thérapies plus efficaces, moins toxiques, possédant une activité pan-génotypique et administrées sur une plus courte durée, tout en évitant l'émergence de mutants de résistance aux antiviraux.

#### **b) ... à la trithérapie ...**

L'approbation récente par la FDA mais aussi par l'Europe, concernant les deux inhibiteurs de protéase à prise orale, le bocéprévir et le télaprévir, en combinaison avec le PEG-IFN- $\alpha$  et la RBV, introduit une ère nouvelle dans le traitement contre l'hépatite C. Ces deux inhibiteurs de la sérine protéase virale NS3/4A ciblent directement le virus (*direct-acting antiviral agents* ou DAAs) et sont associés à une augmentation significative de la SVR, notamment chez les patients infectés par le génotype 1 du HCV.

Afin d'aboutir à une élimination virale, les stratégies de thérapie efficaces contre le HCV doivent à la fois stimuler les mécanismes immunitaires de l'hôte et inactiver les étapes clef du cycle viral. Avec l'utilisation de la trithérapie, l'ARN du HCV est toujours absent du sérum, vingt-quatre semaines après suspension du traitement chez les patients infectés par le génotype 1. Bien qu'étant des inhibiteurs de la même cible virale, ces deux molécules présentent des caractéristiques distinctes. Les principales données les concernant sont résumées dans le tableau 1 (Assis and Lim, 2012). L'assentiment de ces deux inhibiteurs s'est fait après validation de nombreux essais cliniques dont les principaux sont décrits ci-après.

### **i - Le bocéprévir**

Le bocéprévir (Incivek, Vertex) est un inhibiteur de la sérine protéase virale NS3/4A. C'est un peptidomimétique linéaire de type cétoamide (Venkatraman *et al.*, 2006). Cette molécule se lie au niveau du site actif de la protéase NS3 afin d'inhiber la réplication virale dans les cellules infectées par le HCV. La trithérapie associée au bocéprévir consiste en l'administration de PEG-IFN- $\alpha$  2b et de RBV pendant quatre semaines suivie par vingt-quatre à quarante-quatre semaines de trithérapie. Les quatre semaines de traitement avec la bithérapie standard diminuent les niveaux d'ARN du HCV, avant l'action du DAA. Ainsi, le risque d'émergence virale ou de résistance au DAA est diminué (Kwo *et al.*, 2010). Le bocéprévir induit de nombreux effets secondaires. Il est responsable d'une anémie plus sévère que le télaprévir. En revanche, aucun cas de prurit intense, ni de rougeurs n'ont été observés avec le bocéprévir. Comme pour le télaprévir, la prise du bocéprévir doit être arrêtée si la charge virale n'est pas inférieure à 100 IU/ml à la douzième semaine de traitement ou si l'ARN viral est de nouveau détectable après avoir été indétectable. Enfin, une activité limitée a été observée avec le bocéprévir pour les génotypes 2 et 3.

Au cours d'une étude clinique de phase II (SPRINT-1 ou *serine protease inhibitor therapy-1*), l'efficacité et la sûreté du bocéprévir en combinaison avec la bithérapie standard a été évaluée chez des patients n'ayant jamais reçu de traitement. Cette étude montre que le bocéprévir augmente de manière significative la SVR (Kwo *et al.*, 2010). Par la suite, une étude clinique de phase III, SPRINT-2, a été réalisée afin de confirmer ces premiers résultats (Poordad *et al.*, 2011).

L'étude RESPOND-2 (*retreatment with HCV serine protease inhibitor boceprevir and pegIntron/rebetol-2*), quant à elle, a évalué l'efficacité de la trithérapie chez des patients ayant

déjà reçus la bithérapie standard (Bacon *et al.*, 2011). La SVR était de 66% pour la trithérapie contre 21% pour la bithérapie standard.

## ii - Le télaprévir

Le télaprévir (VX950, Victrelis, Merk) est également un inhibiteur de la sérine protéase virale NS3/4A. Cet inhibiteur mime la région C-terminale de NS3 et bloque son activité protéasique en se fixant au niveau du site actif. Cette molécule est capable d'inhiber différentes enzymes impliquées dans la métabolisation des drogues au niveau du foie (telles que le cytochrome P450 2C, le cytochrome 3A4 et le cytochrome 1A). Cette propriété pose problème en ce qui concerne la prescription de certaines drogues, notamment chez les patients co-infectés avec le HIV (Kiser *et al.*, 2012) mais également chez les patients ayant subi une transplantation hépatique (Charlton and Leise, 2011). De plus, l'addition du télaprévir à la bithérapie standard augmente les effets secondaires du traitement. En effet, il n'est pas rare d'observer l'apparition de symptômes tels que, prurit, rougeurs, désordres gastro-intestinaux et anémie chez les patients. Le télaprévir, contrairement au bocéprévir, ne permet pas l'utilisation d'agents stimulant l'érythropoïèse dans la gestion de l'anémie mais requiert une réduction de la dose de RBV. De plus, le nombre de comprimés à prendre est contraignant et demande une logistique importante. En effet, le télaprévir doit être pris avec un repas contenant vingt grammes de lipides afin d'optimiser son absorption. Enfin, la prise de cette molécule doit être arrêtée si le niveau d'ARN ne diminue pas en-dessous de 1000 IU/ml aux semaines quatre ou douze, ou s'il est toujours détectable à la semaine vingt-quatre, ou encore si il y a une ré-émergence après une phase non-virémique au cours du traitement pouvant s'expliquer par la propagation d'une résistance virale à cette classe d'inhibiteurs protéasiques. Le polymorphisme associé au gène *IL-28B* ne semble pas avoir d'effet en ce qui concerne la réponse au traitement constitué de télaprévir (Jacobson *et al.*, 2011 ; Sherman *et al.*, 2011). De plus, le télaprévir n'a pas d'effet antiviral contre le génotype 3 mais un effet notable pour le génotype 2 (Foster *et al.*, 2011).

L'efficacité du télaprévir a été testée au cours d'essais cliniques de phase II (PROVE-1 et PROVE-2) chez des patients infectés avec le génotype 1 n'ayant jamais reçu de traitement (Hézode *et al.*, 2009 ; McHutchison *et al.*, 2009). Au cours de cette étude, il a été montré que la durée du traitement peut être réduite. Enfin, l'augmentation des taux de SVR avec la trithérapie, conforte l'addition du télaprévir en combinaison de la bithérapie standard pour le traitement contre le HCV. Par la suite, un essai clinique de phase III a été mené, ADVANCE. Au cours de cette étude, des personnes infectées avec le génotype 1 du HCV et

n'ayant jamais reçu de traitement auparavant ont été enrôlées (Jacobson *et al.*, 2011). Cette étude a confirmé l'augmentation du taux de la SVR avec l'utilisation du télaprévir en combinaison avec la bithérapie standard. De plus, cette étude a également permis de mettre en évidence que certains critères ethniques sont à prendre en considération, afin d'établir la posologie la plus optimale possible, lors de l'inclusion d'un DAA à la bithérapie standard. Une autre étude, l'étude ILLUMINATE, a permis de comparer, de manière directe, la durée du traitement chez des patients n'ayant jamais reçu de traitement (Sherman *et al.*, 2011). Cette étude a mis en évidence une meilleure tolérance du traitement lorsque celui-ci est administré de manière succincte.

L'étude REALIZE, un essai clinique de phase III a comparé la trithérapie à la bithérapie standard chez des patients ayant déjà reçu un traitement (Zeuzem *et al.*, 2011). Dans cette étude, les patients ont été classés en trois groupes différents. Les non-répondeurs (chez ces patients, la diminution de l'ARN est inférieure à deux logarithmes à la semaine douze), les répondeurs partiels (la diminution de l'ARN est d'au moins deux logarithmes à la semaine douze, mais une virémie persiste tout au long du traitement) et les personnes ayant rechuté (chez ces patients, une réponse virologique précoce apparaît, il y a une réponse à la fin du traitement, mais après arrêt du traitement, les patients rechutent). Cependant, pour tous les groupes, le taux de SVR était nettement amélioré.

Pour conclure, le bocéprévir et le télaprévir, deux inhibiteurs de première génération, exercent un effet antiviral contre le génotype 1 du HCV. Cependant, leur utilisation a engendré l'apparition de mutations de résistance.

### *c) ... en passant par la découverte d'autres molécules ...*

De nouvelles molécules présentant une efficacité augmentée, une barrière à la résistance virale plus élevée, une tolérance accrue, une durée de traitement plus courte et un besoin en IFN réduit sont en cours de développement. Ainsi, ces nouvelles classes d'antiviraux comprennent des nouveaux inhibiteurs de la protéase NS3/4A, des inhibiteurs de la protéine virale NS5A, des inhibiteurs de la polymérase NS5B, mais aussi des inhibiteurs ciblant d'autres composés du génome viral ainsi que des protéines cellulaires nécessaires au cycle viral du HCV. L'efficacité de ces molécules est étudiée en phases cliniques. Les molécules les plus prometteuses seront brièvement décrites et présentées dans le tableau 2.

	<b>Telaprevir (Incivex)</b>	<b>Bocoprevir (Victrelis)</b>
<b>Chemical formula, molecular weight, and structure</b>	$C_{36}H_{53}N_7O_6$ , 679.85 kDa Interconverts to an <i>R-diastereomer</i> , VKT-127394, the major metabolite in plasma	$C_{27}H_{45}N_5O$ , 519.7 kDa Approximately equal mixture of two diastereomers
<b>IC<sub>50</sub></b>	20 nmol/l	14 nmol/l
<b>Formulation</b>	375-mg oral capsule	200-mg oral capsule
<b>Dosing</b>	750 mg every 7-9 h with a fatty meal (12 g fat) Systemic exposure (AUC) to telaprevir was increased by 237% when telaprevir was administered with a standard fat meal (containing 533 kcal and 21 g fat) as compared with when telaprevir was administered under fasting conditions	800 mg every 7-9 h with food
<b>Regimen and duration of treatment</b>	12 weeks of triple therapy followed by Peg-IFN/ ribavirin alone	Start after 4-week lead-in of Peg-IFN and ribavirin
<b>Total daily pill burden</b>	12 (6 telaprevir + 6 ribavirin)	Duration of therapy 28-48 weeks total 18 (12 bocoprevir + 6 ribavirin)
<b>Dose reduction</b>	Not recommended	Not recommended
<b>Discontinuation</b>	If VL > 1,000 IU/ml at week 4 or 12, and VL at week 24	If VL > 100 IU/ml at week 8, 12, and VL at week 24
<b>Expected SVR</b>	Naive: 69-75% Relapser: 84-88% Partial responder: 56-61% Null responder: 31-33%	Naive: 63-66% Relapser: 69-75% Partial responder: 40-52% Null responder: not studied
<b>Response-guided therapy</b>	If negative VL at weeks 4 and 12, treat with Peg-IFN/ribavirin for 12 more weeks If not, treat for 36 more weeks Note: VL must be "undetectable" and NOT "detectable but below quantification limit"	Treatment-naïve: if negative VL at week 8 and 24, complete treatment at week 28 Previously treated: if negative VL at week 8 and 24, complete treatment at week 36
<b>Barrier to resistance</b>	Low (V3M6, R155K)	Low (V3M6, R155K)
<b>Common adverse effects</b>	Anemia (37%) Rash (56%; severe in 4-7%) Anal itching/burning (29%)	Anemia (49%) Dysgeusia (43%)
<b>Metabolism</b>	Hepatic (CYP450)	Hepatic (CYP450 and aldoketoreductase)
<b>Drug-drug interactions</b>	Strong inhibitor of CYP3A	Strong inhibitor of CYP3A4/5 and is partly metabolized by CYP3A4/5
<b>Contra-indications</b>	Pregnancy (due to ribavirin) Coadministration with drugs highly dependent on CYP3A for clearance (rifampin, St John's wort ( <i>Hypericum perforatum</i> ), atorvastatin, lovastatin, simvastatin, sildenafil (Revatio) or tadalafil (Adeira), orally administered midazolam, triazolam)	Pregnancy (due to ribavirin) Coadministration with drugs highly dependent on CYP3A4/5 for clearance
<b>FDA-labeled indication</b>	Chronic HCV genotype 1a or 1b in combination with Peg-IFN and ribavirin, in adults with compensated liver disease (Child-Pugh <7).	Chronic HCV genotype 1a or 1b, in combination with Peg-IFN and ribavirin, in adults with compensated liver disease, including cirrhosis, who are previously untreated or who failed previous Peg-IFN/ribavirin treatment
<b>Comments</b>	Was studied in prior null responders	Not studied in prior null responders
<b>Special populations</b>	Not approved in decompensated cirrhosis, HIV-HCV or HBV-HCV coinfection, pediatrics, posttransplant	Not approved in decompensated cirrhosis, HIV-HCV or HBV-HCV coinfection, pediatrics, posttransplant
<b>Renal or hepatic adjustment</b>	Renal: none Hepatic: do not use if CPT score >7	Renal: none Hepatic: do not use if CPT score >7
<b>Estimated cost</b>	12 weeks: \$55,429.92	24 weeks: \$28,526.40

AUC, area under the curve; CPT, Child-Pugh Turcotte score; FDA, US Food and Drug Administration; HBV, hepatitis B virus; HCV, hepatitis C virus; IC<sub>50</sub>, half maximal inhibitory concentration; IFN, interferon; R155K, lysine to arginine substitution at position 155; SVR, sustained virologic response; VL, viral load; V3M6, valine to methionine substitution at position 36.

**Tableau 1. Comparaison des principales caractéristiques concernant le télaprévir et le bocoprévir.**  
D'après (Assis and Lim, 2012).

Drug category	Target	EC <sub>50</sub>	Dosing	Regimen	Phase II	Phase III	RGT
<b>Protease inhibitors</b>							
TMC435	NS3/4A	8 nmol/l	Once daily	+ Peg-IFN, RBV	SVR 68-76%	N/A	Yes
Asunaprevir	NS3	1-4 nmol/l	Twice daily	+ Daclatasvir	SVR 27%	N/A	No
ACH-1625	NS3	1 nmol/l	Once daily	+ Peg-IFN, RBV	SVR 75-81%	N/A	No
<b>Nucleoside PI</b>							
PSI-7977	NS5B	92 nmol/l	Once daily	+ Peg-IFN, RBV	N/A	N/A	Yes
Mericitabine	NS5B	25 nmol/l	Twice daily	+ Peg-IFN, RBV	SVR in 91% of eRVR	N/A	Yes
<b>Non-nucleoside PI</b>							
VX-222	NS5B	41-65 nmol/l	Twice daily	+ Telaprevir, RBV, Peg-IFN	SVR 82-93%	N/A	Yes
Setrobuvir (ANA598)	NS5B	3-50 nmol/l	Twice daily	+ Peg-IFN, RBV	SVR 73-75%	N/A	No
<b>NS5A inhibitors</b>							
Daclatasvir	NS5A	9-50 pmol/l	Once daily	+ Asunaprevir	SVR 27%	N/A	Yes
GS5885	NS5A	34 pmol/l	Once daily	+ Peg-IFN, RBV	SVR 90%	N/A	No
<b>Cyclophilin inhibitors</b>							
Alisporivir	Cyclophilin	200 nmol/l	Once daily	+ Peg-IFN, RBV	SVR 76%	N/A	Yes

EC<sub>50</sub>, half maximal effective concentration; eRVR, extended rapid virologic response; N/A, not applicable; Peg-IFN, pegylated interferon; PI, protease inhibitor; RBV, ribavirin; RGT, response-guided therapy; SVR, sustained virologic response.

**Tableau 2. Les agents antiviraux ciblant directement la particule virale (DAAs) les plus prometteurs en cours d'étude.**  
D'après (Assis and Lim, 2012).

### i - Les autres inhibiteurs de la protéase

De manière générale, les autres inhibiteurs de la protéase présentent certains avantages par rapport au bocéprévir et au télaprévir. Par exemple, une prise quotidienne suffit à l'exercice de leur activité antivirale. C'est notamment le cas pour les inhibiteurs BI201335 (Boehringer-Ingelheim), TMC435 (Tibotec/Janssen-Cilag) ou encore asunaprevir (BMS-650032 - Bristol-Myers Squibb). Cependant, ces inhibiteurs ne sont pas parfaits. En effet, des troubles gastro-intestinaux, à l'origine de l'arrêt du traitement, sont observés chez certains patients (Sulkowski *et al.*, 2011). Toutefois, la molécule TMC435 possède un effet antiviral contre les génotypes 2, 4, 5 et 6 (en plus du génotype 1) alors qu'elle n'a aucun effet contre le génotype 3 (Moreno *et al.*, 2012). D'autres inhibiteurs tels que, ACH-1625 (Achillion), le vaniprevir (MK-7009 - Merck), le danoprevir (ITMN191/RG7227 - Roche/Genentech), le narlaprevir (SCH900518 - Merck), PHX1766 (Phenomix), ABT-450 (Abbott), GS-9256 (Gilead) et GS-9451 (Gilead) sont également des inhibiteurs de protéase en cours d'essai clinique. Ces molécules ont des potentiels antiviraux du même ordre de grandeur que ceux observés pour le télaprévir et le bocéprévir. Par

conséquent, ces inhibiteurs soulèvent de grands espoirs concernant une amélioration de la pharmacocinétique et de la tolérance.

Un inhibiteur de protéase de seconde génération : MK-5172 (Merck) a montré une activité antivirale pan-génotypique (y compris contre le génotype 3), avec un profil amélioré concernant l'apparition de mutations de résistance (Summa *et al.*, 2012). Cependant, l'absence d'essais *in vivo* ne permettent pas de conclure quant à son profil définitif de résistance.

## ii - Les inhibiteurs de la protéine virale NS5A

Actuellement, les inhibiteurs de la protéine virale NS5A en cours de développement clinique, se lient au domaine I de la protéine NS5A. Par exemple, l'inhibiteur daclatasvir (BMS-790052 - Bristol-Myers Squibb), qui est actif contre tous les génotypes viraux dans les études *in vitro*, est actuellement en essai clinique de phase II. Son utilisation en trithérapie, dans un essai clinique de phase IIa, chez des patients n'ayant jamais été traités et étant infectés avec le génotype 1, a montré une SVR améliorée (Pol *et al.*, 2012). Un autre inhibiteur, la molécule GS5885 fait également l'objet d'une étude clinique de phase II (Lawitz *et al.*, 2012).

Il existe d'autres inhibiteurs de la protéine NS5A : SCY-465 (Scynexis), BMS-824393 (Bristol-Myers Squibb), AZD7295 (Arrow Therapeutics/AstraZeneca), PPI-461 (Presidio) et GS-5885 (Gilead). Cependant, des mutations de résistance ont déjà été répertoriées pour certains d'entre eux.

## iii - Les inhibiteurs de la polymérase

Pour l'ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp) NS5B, il existe deux types d'inhibiteurs. Les analogues nucléosidiques/nucléotidiques qui bloquent cette enzyme en se fixant au niveau de son site actif et les inhibiteurs allostériques ou non-nucléosidiques/non-nucléotidiques, qui inhibent l'activité de l'enzyme en se fixant à distance du site actif.

- Les inhibiteurs nucléos(t)idiques

Les inhibiteurs nucléosidiques/nucléotidiques de l'ARN polymérase NS5B sont des analogues ciblant le site actif de cette protéine virale. Afin d'être actifs intracellulairement, ces composés nécessitent respectivement deux et trois étapes de phosphorylation. Ces molécules agissent comme des leurres pour la RdRp en induisant, suite à leur incorporation,

une terminaison précoce de l'ARN en cours de synthèse. De manière importante, le site actif de la RdRp est très conservé entre les différents génotypes viraux ce qui explique l'activité pan-génotypique de ces molécules. Actuellement, différents inhibiteurs sont en cours d'essais cliniques. Par exemple, l'inhibiteur GS-7977, un analogue de l'uridine, a été utilisé en combinaison avec la bithérapie standard, dans une étude clinique de phase IIb. Cet inhibiteur arbore une SVR de 91% chez des patients infectés avec le génotype 1 n'ayant jamais été traités auparavant (Lawitz *et al.*, 2011). Parmi ces inhibiteurs nucléotidiques, certains ne nécessitent qu'une prise journalière : les molécules PSI-7977 (Pharmasset/Gilead), IDX-184 (Idenix) et PSI-938 (Pharmasset/Gilead). De plus, chez les patients infectés avec le génotype 1, les inhibiteurs PSI-7977 et PSI-938 diminuent le niveau d'ARN du HCV (Lawitz *et al.*, 2011).

- Les inhibiteurs non-nucléos(t)idiques

Les inhibiteurs non-nucléosidiques/non-nucléotidiques se lient sur l'un des quatre sites allostériques de la polymérase virale. Parmi ces inhibiteurs, les molécules BILB1941 (Boehringer-Ingelheim), MK-3281 (Merck), BI207127 (Boehringer-Ingelheim), VX-222 (Vertex), le sétrobuvir (ANA598) et le tégobuvir (GS-9190 - Gilead) sont retrouvées. Pour ces inhibiteurs de la polymérase virale, des mutants de résistance ont été observés, soit *in vitro*, soit *in vivo*.

#### **iv - Les inhibiteurs des protéines et des facteurs de l'hôte impliqués dans le cycle du virus de l'hépatite C**

Afin d'éliminer le HCV, d'autres stratégies antivirales consistent à cibler les protéines ou les facteurs de l'hôte nécessaires au cycle du HCV (Khattab, 2009). Ainsi, cibler les facteurs cellulaires impliqués dans le cycle du HCV constitue une bonne approche puisque le risque de résistance à la drogue est plus réduit. Cependant, de telles stratégies impliquent l'évaluation de la toxicité cellulaire de la drogue.

- Les inhibiteurs des cyclophilines

Les cyclophilines sont des chaperones ubiquitaires impliquées dans le repliement des protéines. La cyclophiline A est essentielle pour l'étape de réplication virale du HCV (Chatterji *et al.*, 2009 ; Kaul *et al.*, 2009 ; Lohmann *et al.*, 2009). La cyclosporine non immunosuppressive alisporivir (DEBO25 - Novartis) est efficace *in vitro* et *in vivo* chez les patients infectés par le HCV et le HIV (Paeshuyse *et al.*, 2006 ; Flisiak *et al.*, 2008 ; Flisiak *et*

*al.*, 2009). Toutefois, actuellement, le développement de cet inhibiteur est suspendu puisque ce dernier est à l'origine de pancréatites mortelles.

- Les inhibiteurs du microRNA-122

Le microRNA-122 est essentiel pour la régulation des niveaux d'ARN du HCV (Jopling *et al.*, 2005 ; Jopling, 2008). Le traitement des chimpanzés avec l'oligonucléotide SPC3649 supprime la virémie associée au HCV sans signe de résistance (Lanford *et al.*, 2010).

- Les autres inhibiteurs

Actuellement, les inhibiteurs en cours de développement ciblent préférentiellement l'étape de réplication virale. Néanmoins, afin de limiter la propagation du HCV, l'entrée virale représente une cible de choix. En effet, cette étape peut être inhibée en ciblant, le virus ou les facteurs cellulaires nécessaires au virus pour rentrer dans la cellule ou le processus de fusion ... Ainsi, plusieurs molécules sont en cours de développement. Parmi les plus prometteuses, la molécule ITX-5061, un antagoniste du facteur d'entrée SR-BI (*scavenger receptor class B type I*) est en essai clinique de phase II. Cet inhibiteur bloque l'entrée du HCV dans la cellule (Syder *et al.*, 2011). D'autres molécules telles que la molécule EI-1 (Baldick *et al.*, 2010), la griffithsine (Meuleman *et al.*, 2011b) ou des anticorps monoclonaux (Meuleman and Leroux-Roels, 2008 ; Meuleman *et al.*, 2008 ; Fofana *et al.*, 2010 ; Meuleman *et al.*, 2012) pourraient également constituer des molécules à fort potentiel thérapeutique.

Enfin, l'activité canal ionique de la protéine p7 peut être inhibée par la molécule BIT225 (Luscombe *et al.*, 2010).

(Pour revues sur les antiviraux : (Assis and Lim, 2012 ; Ploss and Dubuisson, 2012 ; Poordad and Dieterich, 2012 ; Salloum and Tai, 2012 ; Sarrazin *et al.*, 2012 ; Wartelle-Bladou *et al.*, 2012)).

#### ***d) ... vers un traitement sans interféron ?***

De manière générale, les problèmes associés aux DAAs sont la sélection et l'apparition de mutants de résistance dûe à la forte pression exercée par ces molécules sur le virus. Le problème peut être résolu en combinant plusieurs molécules. De plus, l'apparition d'effets secondaires additionnels constitue un obstacle supplémentaire pour les patients étant déjà intolérants à la bithérapie standard. En outre, cette trithérapie ne peut être recommandée dans le cadre de cirrhoses décompensées et de post-transplantation hépatique. Ainsi, il est

nécessaire de développer de nouvelles stratégies antivirales plus sûres et dépourvues d'IFN. En 2011, l'accord de la FDA concernant la mise sur le marché du bocéprévir et du télaprévir semble être un tremplin vers le but ultime : éradiquer le HCV à l'aide d'une médication orale et dépourvue d'IFN. Dans cette logique, de nombreuses études sont menées afin d'évaluer l'efficacité de différentes combinaisons de DAAs (Gane *et al.*, 2010 ; Garber, 2011 ; Lok *et al.*, 2012).

Pour conclure, en l'absence d'IFN, cibler le virus à différentes étapes du cycle viral afin d'avoir une action synergique et éviter la sélection de variants de résistance, semble constituer une bonne approche antivirale. Les différentes études menées en essai clinique de phase II sont listées dans le tableau 3.

### **7) Perspective de vaccination**

Actuellement, il n'existe pas de vaccin contre le HCV. Toutefois, de nombreux essais cliniques sont menés. Ces derniers englobent aussi bien des vaccins à fin prophylactique qu'à fin thérapeutique (Houghton and Abrignani, 2005 ; Strickland *et al.*, 2008 ; Gal-Tanamy *et al.*, 2009 ; Major, 2009 ; pour revue Roohvand and Kossari, 2012) (Tableau 4). Généralement, les études menées sur les vaccins prophylactiques sont réalisées sur un nombre restreint de chimpanzés. En effet, il est impossible de tester ces vaccins chez l'homme. De plus, l'analyse statistique de l'efficacité de ces derniers impliquerait la vaccination d'un grand nombre d'individus au sein d'un réservoir à haut risque de transmission de la maladie.

Il existe deux types de vaccins prophylactiques. Les vaccins prophylactiques induisant des réponses cellulaires de type T et ciblant les protéines non structurales du HCV et ceux induisant des réponses de neutralisation et faisant intervenir les anticorps. En général, ces derniers ciblent les glycoprotéines d'enveloppe du virus. En 1994, Choo *et al.* ont injecté à des chimpanzés des hétérodimères purifiés des glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2. En réponse à une stimulation avec un virus du même génotype, les animaux ont développé une immunité humorale et une immunité cellulaire. Ainsi, les animaux étaient protégés du développement d'une infection chronique (Choo *et al.*, 1994). Ce vaccin est actuellement en essai clinique. En 2006, Folgori *et al.*, ont utilisé deux virus de sous-génotypes différents lors d'une stratégie de vaccination prophylactique. Un virus de génotype 1a a été utilisé pour le vaccin, alors qu'un virus de génotype 1b a été utilisé pour la stimulation (Folgori *et al.*, 2006). Récemment, une nouvelle stratégie de vaccination a été élaborée. Cette dernière consiste à induire des réponses cellulaires T (CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>) en utilisant des vecteurs adénoviraux exprimant les protéines non structurales du HCV (de génotype 1b). De manière intéressante,

des réponses cellulaires T importantes et soutenues ainsi qu'une immunité protectrice ont été obtenues avec ce vaccin (Barnes *et al.*, 2012). D'autres approches vaccinales qui consistent à immuniser génétiquement des animaux avec des vecteurs plasmidiques ADN ou des vecteurs viraux atténués ou défectueux exprimant diverses protéines virales du HCV afin de stimuler l'expression génique et l'immunogénicité chez l'hôte ont également été mises en œuvre (Pancholi *et al.*, 2003 ; Abraham *et al.*, 2004). De manière générale, les vaccins prophylactiques en développement comprennent des peptides synthétiques correspondant à des épitopes spécifiques et conservés du HCV. Ils sont administrés seuls, en combinaison, ou sous forme de polypeptides synthétiques comportant de multiples épitopes.

Les vaccins thérapeutiques sont, quant à eux, utilisés afin d'améliorer les traitements actuels utilisés contre le HCV (Houghton and Abrignani, 2005). En effet, certaines données suggèrent que l'efficacité de la bithérapie (PEG-IFN- $\alpha$  et RBV) est liée à la réponse immunitaire adaptative humorale et cellulaire de l'hôte (Baumert *et al.*, 2000 ; Freeman *et al.*, 2005 ; Caetano *et al.*, 2008). Par exemple, le vaccin IC41 (Intercell), contenant cinq peptides conservés, présents dans les protéines core, NS3 et NS4 du HCV, induit une réponse cellulaire de type T. Malgré la fiabilité de ce vaccin (Firbas *et al.*, 2006 ; Klade *et al.*, 2008), ce dernier ne peut être utilisé en monothérapie puisqu'il n'induit qu'une faible réponse antivirale. Toutefois, lorsqu'il est utilisé en combinaison avec la bithérapie standard, une réponse virologique soutenue importante est obtenue (Wedemeyer *et al.*, 2009). Enfin, la vaccination thérapeutique peut stimuler la réponse immunitaire innée, par exemple en incluant des motifs CpG dans un vaccin ADN.

Le développement de stratégies de vaccinations prophylactiques et thérapeutiques est nécessaire dans la lutte menée contre le HCV (Houghton and Abrignani, 2005 ; Strickland *et al.*, 2008). Les résultats encourageants obtenus récemment avec la trithérapie laissent à penser que certains de ces vaccins pourront être efficaces contre le HCV.

Drugs	GT	Cohort	N	Dosing	Duration	DAA SVR
Daclatasvir + asunaprevir	1	Null responders	11	60 mg Daclatasvir q.d. 600 mg Asunaprevir b.i.d.	24 weeks	36% Overall -2/2 GT1a -2/9 GT1b
Daclatasvir + asunaprevir	1b	Null responders	10	60 mg Daclatasvir q.d. 600 mg Asunaprevir b.i.d. (reduced to 200 mg during clinical trial)	24 weeks	90%
BI201335 + BI207127 + ribavirin	1	Naive	81	120 mg BI201335 q.d. 600 mg BI207127 i.i.d. Weight-based ribavirin	16 weeks	59% Overall -43% GT1a -69% GT1b
GS-7977 + ribavirin	1	Naive	25	400 mg GS-7977 q.d. Weight-based ribavirin	12 weeks	59%
GS-7977 + ribavirin	1	Naive	25	400 mg GS-7977 q.d. Weight-based ribavirin	12 weeks	88%
GS-7977 + ribavirin	2,3	Naive	10	400 mg GS-7977 q.d. -based ribavirin	12 weeks	100%
GS-7977 without ribavirin	2,3	Naive	10	400 mg GS-7977 q.d. without ribavirin	12 weeks	60%
GS-7977 + ribavirin	1	Null	9	400 mg GS-7977 q.d. Weight-based ribavirin	12 weeks	11%
ABT-450 + ritonavir + ABT-333 + ribavirin	1	Naive	33	150-250 mg ABT-450 q.d. 100 mg Ritonavir q.d. 400 mg ABT-333 q.d. Weight-based ribavirin	12 weeks	93-95%
ABT-450 + ritonavir + ABT-333 + ribavirin	1	Experienced	17	150 mg ABT-450 q.d. 100 mg Ritonavir q.d. 400 mg ABT-333 q.d. Weight-based ribavirin	12 weeks	47%
ABT-450 + ritonavir + ABT-072 + ribavirin	1	Naive	11	150 mg ABT-450 q.d. 100 mg Ritonavir q.d. 400 mg ABT-072 q.d. Weight-based ribavirin	12 weeks	82%
Danoprevir + ritonavir + mericitabine + ribavirin	1	Naive	149	100 mg Danoprevir q.d. 100 mg Ritonavir q.d. 1,000 mg Mericitabine b.i.d. Weight-based ribavirin	24 weeks	41% -71% GT1b -26% GT1a
Daclatasvir + GS-7977 + ribavirin	1	Naive	44	60 mg Daclatasvir q.d. 400 mg GS-7977 q.d. Weight-based ribavirin	24 weeks	100%

DAA, directly acting antiviral agent; GT, genotype; SVR, sustained virologic response.

**Tableau 3. Récapitulatif des différentes études menées en essai clinique de phase II concernant l'utilisation de diverses molécules en l'absence d'interféron.**  
D'après (Assis and Kim, 2012).

Type	Clinical goal	Immunogen	Company	Phase of the clinical trial					Results
				Pre	I	II	III	IV	
Recombinant proteins	Prevention	E1/E2 in oil/water adjuvant	Chiron / Novartis						Humoral and cellular immune responses May protect against chronic infection with closely related virus in chimpanzee
	Therapy	Core in ISCOMATRIX adjuvant	Chiron / Novartis and CSL						Primes T-cell responses in macaques
		NS3-NS4-NS5-Core in ISCOMATRIX adjuvant	Chiron / Novartis and CSL						Primes T-cell responses in chimpanzees
Synthetic peptides	Therapy	Core, NS3 and NS4 peptides with poly-arginine adjuvant (IC41)	Intercell						T-cell responses in HCV-infected patients but no significant decrease in viral load except in case of a high initial viral load
		HCV peptides formulated with influenza virosomes	Pevion Biotech						T-cell responses in mice
		Peptide cocktail derived from E1, E2, NS3, NS5A	Kurume University						Humoral and cellular immune responses in HCV-infected patients
DNA	Therapy	Chron-Vac-C, NS3-4a DNA vaccine	Tripep and Inovio						Transient effect on viral load in HCV-infected patients
Recombinant vectors	Prevention	MVA expressing NS3, NS4 and NS5B (TG 4040)	Transgene						Decrease in viral load in some patients
	Therapy	Heat-killed yeast expressing Core and NS3 (GI-505, Tarmogen)	Globe-Immune						T-cell responses in mice

**Tableau 4. Les principaux vaccins thérapeutiques et prophylactiques anti-HCV en cours d'étude clinique.**

Adapté de (Gal-Tanamy *et al.*, 2009).

## Partie II – Le virus de l'hépatite C

### A. Découverte du virus de l'hépatite C

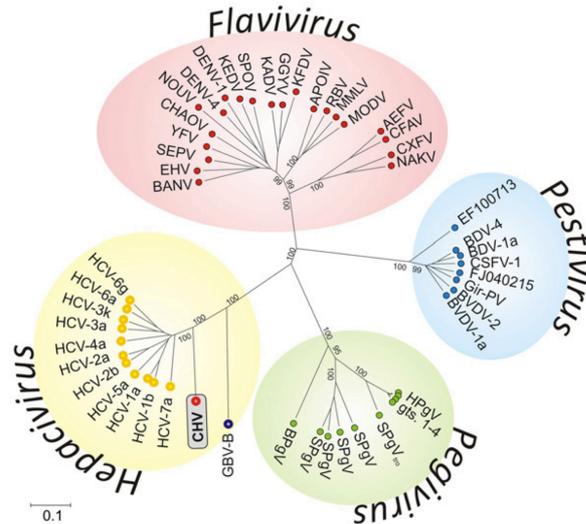
En 1975, seuls les virus des hépatites A et B étaient connus comme pouvant être les agents étiologiques responsables d'une hépatite virale. Cependant, pour 10% des transfusions sanguines, une hépatite virale, n'étant pas due à ces deux virus, se développait. À l'époque, l'entité étiologique responsable de ces cas d'hépatite virale était encore inconnue et non identifiée. Dans un premier temps, cette entité a été appelée le virus de l'hépatite non-A non-B (virus de l'hépatite NANB) (Alter *et al.*, 1975 ; Feinstone *et al.*, 1975). À la suite de diverses expériences, ce virus a été caractérisé physiquement : c'est un petit virus enveloppé (Bradley *et al.*, 1983 ; Feinstone *et al.*, 1983 ; Bradley *et al.*, 1985 ; He *et al.*, 1987). En 1989, avec l'arrivée du modèle animal du chimpanzé (Alter *et al.*, 1978 ; Bradley *et al.*, 1985 ; He *et al.*, 1987) et l'apparition de nouvelles techniques de biologie moléculaire (telles que la PCR (Mullis and Faloona, 1987)), son identification moléculaire a été possible.

C'est ainsi qu'en 1989, le virus de l'hépatite NANB a été dénommé virus de l'hépatite C par le Dr Michael Houghton (Chiron, États-Unis). Ce virus a été identifié en criblant une banque d'ADN complémentaires issus du plasma d'un chimpanzé infecté, avec les anticorps présents dans le sérum d'un patient souffrant d'une hépatite chronique NANB. Ainsi, en 1989, Choo *et al.* ont isolé parmi plusieurs milliers de clones différents, un premier et unique clone du HCV (Choo *et al.*, 1989).

### B. Généralités sur le virus de l'hépatite C

#### 1) Classification et variabilité génomique

Les études sur la séquence et l'organisation génomique du HCV ont montré que ces dernières possèdent des similitudes avec les membres de la famille des *Flaviviridae* (Choo *et al.*, 1991) (Figure 7). Le virus de l'hépatite C est un des représentant du genre *Hepacivirus* de cette famille (Kapoor *et al.*, 2011 ; Burbelo *et al.*, 2012). D'autres genres, les *Flavivirus*, les *Pestivirus* et les *Pegivirus* composent cette famille. Toutefois, le HCV se distingue de ces derniers par l'organisation de ses protéines structurales (Choo *et al.*, 1991).



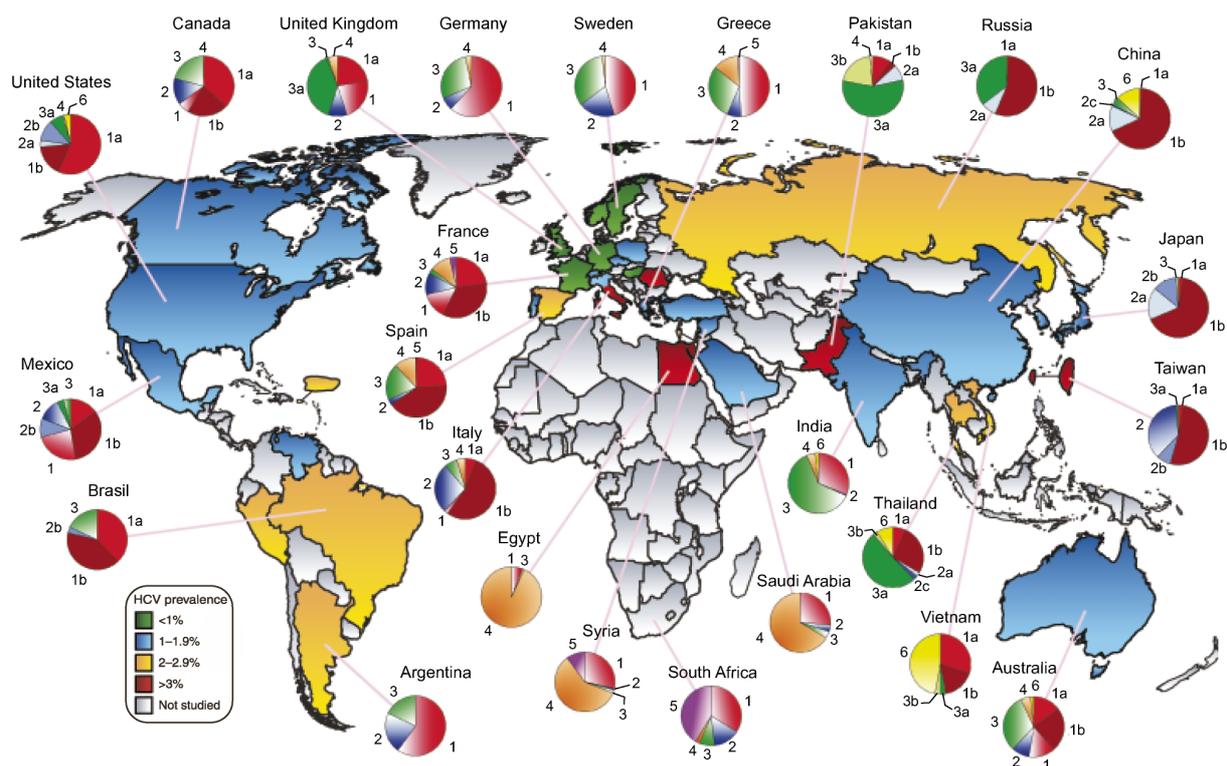
**Figure 7. Arbre phylogénétique de la famille des *Flaviviridae*.**

Cet arbre est basé sur une comparaison des séquences de l'ARN polymérase.

D'après (Kapoor *et al.*, 2011).

Comme la majorité des virus à ARN, le génome du HCV code pour ses propres protéines virales. Ces dernières sont essentielles pour la réplication virale, une étape réalisée par une ARN polymérase ARN-dépendante. Cette enzyme ne possède pas d'activité de relecture, ni de correction des erreurs. Ainsi, des mutations apparaissent et s'accumulent au cours des cycles de réplication. En effet, la fréquence d'erreur de l'ARN polymérase ARN-dépendante du HCV est de  $10^{-4}$  à  $10^{-5}$  par nucléotide. De plus, environ  $10^{12}$  virions sont produits chaque jour (Neumann *et al.*, 1998). Ainsi, une grande diversité génétique est retrouvée au sein même d'un individu infecté mais aussi entre différents individus infectés par ce virus.

Les analyses phylogénétiques ont permis de classer les variants du HCV en sept génotypes (Murphy *et al.*, 2007 ; Gottwein *et al.*, 2009) ainsi qu'en sous-types viraux (Simmonds *et al.*, 1993 ; Simmonds *et al.*, 2005). Ces génotypes se répartissent de manière diversifiée à la surface du globe terrestre (Figure 8). De plus, ils ne répondent pas de la même manière à la bithérapie standard (voir partie I.B.6.a.iii.) et n'induisent pas la même sévérité de la maladie (Zein, 2000). D'un point de vue de leur séquence nucléotidique, les génotypes viraux diffèrent de 21 à 32% (Simmonds *et al.*, 1993). Par conséquent, chez un patient infecté, le HCV circule sous la forme d'une quasi-espèce virale en constante évolution. Ainsi, le HCV échappe aux différents acteurs de la réponse immunitaire de l'hôte, mais aussi aux traitements antiviraux, et enfin, retarde la découverte d'un vaccin.



**Figure 8. Répartition mondiale des différents génotypes du HCV.**

D'après (Negro and Alberti, 2011).

## 2) Propriétés biophysiques de la particule virale

Le virus de l'hépatite C est un virus enveloppé, de forme sphérique, dont le diamètre moyen est de 60 nm (Kaito *et al.*, 1994). Il est constitué d'une nucléocapside d'environ 30 nm de diamètre et d'une enveloppe lipidique dans laquelle sont insérées les protéines d'enveloppe E1 et E2, hautement glycosylées (Figure 9) (Matsuura *et al.*, 1992 ; Lanford *et al.*, 1993 ; Ralston *et al.*, 1993). Dans le sang de certains patients infectés, le HCV peut circuler à des titres pouvant atteindre  $10^9$  à  $10^{11}$  génomes équivalents par millilitre de plasma (Herrmann *et al.*, 2000). Il forme des complexes avec les composés du sérum tels que les lipoprotéines, les anticorps, les facteurs rhumatoïdes mais aussi les cryoglobulines (Thomssen *et al.*, 1993 ; Nielsen *et al.*, 2006).

La densité des particules du HCV présentes dans le sérum diffère selon la méthode d'analyse utilisée et l'échantillon d'origine (Thomssen *et al.*, 1993 ; André *et al.*, 2002). Toutefois, ces particules sédimentent selon deux ou trois populations distinctes dans les expériences de gradient de densité (Choo *et al.*, 1995 ; Trestard *et al.*, 1998 ; Nielsen *et al.*, 2006). La fraction la plus légère ( $< 1,06$  g/ml) contient des virions infectieux associés aux

lipoprotéines de très faible et de faible densité (*very low- ou low-density lipoproteins* (VLDL ou LDL)). Ces particules sont essentiellement détectées chez les patients en phase aigüe de l'infection. Enfin, les particules de haute densité ( $> 1,21$  g/ml) sont, quant à elles, associées avec des immunoglobulines. Ces dernières sont peu infectieuses et sont souvent observées chez des patients immunocompétents (Hijikata *et al.*, 1993). De plus, des nucléocapsides non enveloppées peuvent également être retrouvées dans le sérum de patients infectés (Maillard *et al.*, 2001). La contribution de chacune de ces fractions dans l'infection est difficile à estimer. L'infectivité de ces particules ne peut être complètement évaluée chez les chimpanzés. De plus, la nature de l'association entre le HCV et les VLDL ou LDL n'est toujours pas connue (Huang *et al.*, 2007). Cette dernière pourrait refléter le mécanisme d'assemblage et de sécrétion de la particule virale mais aussi protéger le virion de l'action des anticorps neutralisants. Enfin, une étude de fusion entre des particules du HCV produites en culture cellulaire et des liposomes a suggéré que les particules de faible densité présentaient une plus forte fusogénicité (Haid *et al.*, 2009).

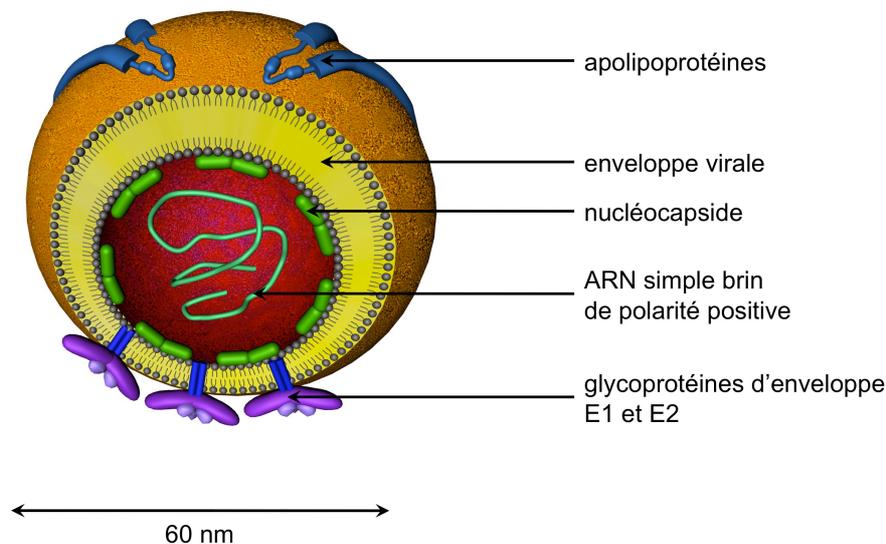


Figure 9. Représentation schématique d'une particule du HCV.

### 3) Organisation génomique

#### a) Vue d'ensemble du génome du virus de l'hépatite C

Le génome du HCV est un ARN simple brin de polarité positive de 9,6 kilobases (kb). Cet ARN, constitué par un unique cadre ouvert de lecture (ORF), est flanqué en 5' et 3' par

deux régions non codantes (*untranslated regions* ou régions UTR). Il code pour une polyprotéine unique d'environ trois mille acides aminés. À la suite de différents clivages, les trois protéines structurales (la protéine de capsid, encore appelée core et les deux glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2), mais aussi les sept protéines non structurales (les protéines p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B) sont générées. Enfin, un décalage du cadre ouvert de lecture au niveau de la protéine de capsid pourrait conduire à la production d'une protéine supplémentaire : la protéine F (*frameshift protein*), encore dénommée ARFP (*alternative reading frame protein*) (Figure 10).

### ***b) La région 5' non codante***

La région 5' UTR est une région structurée et conservée parmi tous les génotypes viraux. Elle contient quatre grands domaines (numérotés de I à IV), composés par des structures en tiges-boucles (Wang *et al.*, 1995 ; Honda *et al.*, 1996 ; Honda *et al.*, 1999). Cette région contient un site d'entrée interne des ribosomes (*internal ribosome entry site* ou IRES) qui médie la traduction de l'ORF en absence de coiffe (voir partie II.D.2.). Ainsi, en recrutant la sous-unité ribosomale 40S, l'IRES est capable de former un complexe stable d'initiation de la traduction. La totalité de la région 5' UTR est requise pour la réplication de l'ARN. En effet, des séquences situées dans les domaines I et II de cette région sont nécessaires à cette étape (Friebe *et al.*, 2001 ; Kim *et al.*, 2002). En outre, des structures conservées dans la séquence complémentaire de la région 5' UTR servent de site d'initiation pour la synthèse des brins positifs d'ARN (Mahias *et al.*, 2010). Enfin, du fait de son extrême conservation et de son importance, la région 5' UTR constitue une cible de choix pour la thérapie anti-HCV basée sur l'ARN interférence (Kanda *et al.*, 2007).

### ***c) La région 3' non codante***

La région 3' UTR correspond aux derniers nucléotides du génome viral. Cette région est organisée en trois parties : une première peu conservée d'environ quarante nucléotides, une deuxième constituée par un motif poly(U/UC) qui régule la réplication et une troisième très conservée de quatre-vingt-dix-huit nucléotides appelée la région X-tail (Kolykhalov *et al.*, 1996). De manière importante, il n'existe pas de queue poly(A) dans la région 3' UTR du HCV. Cependant, la région X-tail pourrait suppléer ce rôle. Cette dernière, très conservée, se présente sous la forme d'une structure secondaire formée de trois tiges-boucles (Tanaka *et al.*, 1996). Afin d'initier la réplication, des éléments conservés de cette région 3' UTR sont essentiels. En effet, ils peuvent être utilisés comme séquence d'initiation pour la synthèse des

brins d'ARN négatifs (Kolykhalov *et al.*, 2000). De plus, la région 3' UTR est nécessaire pour la réplication de l'ARN viral (Yi and Lemon, 2003) mais peut également être impliquée dans la traduction du génome viral, sa stabilisation ainsi que son encapsidation (Song *et al.*, 2006).

#### **4) Les protéines codées par le génome du virus de l'hépatite C et leur rôle au cours du cycle viral infectieux**

Généralement, les virus à ARN possèdent de petits génomes. Malgré une information génétique restreinte, ces virus ont développé diverses stratégies afin de se répliquer de manière efficace. Par conséquent, afin d'accomplir leur cycle viral, ces virus utilisent de nombreux facteurs cellulaires et détournent de nombreuses fonctions cellulaires à leur avantage. De plus, une seule et même protéine virale peut remplir diverses fonctions. Ainsi, le virus de l'hépatite C, dont le génome viral ne code que pour une dizaine de protéines, utilise certaines de ces stratégies (Figure 10).

##### ***a) Le clivage de la polyprotéine, la localisation subcellulaire et l'ancrage membranaire des protéines virales du virus de l'hépatite C***

Grâce à un signal peptide présent dans la séquence codante à la jonction de core et E1, la polyprotéine du HCV est ciblée vers le ER. Ainsi, les ribosomes associés à la membrane de cette organelle synthétisent la forme précurseur de cette polyprotéine virale. Par la suite, la polyprotéine précurseur est clivée co- et post-traductionnellement par diverses protéases afin de générer les protéines virales matures. Les protéines structurales ainsi que le polypeptide p7 sont maturés par le complexe signal peptidase du ER qui clive entre C/E1, E1/E2, E2/p7 et p7/NS2. De plus, la protéine de capsid est libérée par une signal peptide peptidase (une protéine de clivage intra-membranaire du ER) au niveau du signal peptide. Deux autres protéases virales clivent le restant de la polyprotéine. L'autoprotéase NS2-3, qui possède une activité à cystéine, clive la jonction entre les protéines NS2 et NS3. De même, la sérine protéase virale NS3-4A clive l'extrémité C-terminale de la protéine NS3 ainsi que d'autres sites en aval (Figure 10).

En résumé, toutes les protéines du HCV sont étroitement associées aux membranes (pour revue (Dubuisson *et al.*, 2002)). De plus, les membranes semblent être très importantes puisque, *in vitro*, la traduction des protéines virales dépend de leur présence (Svitkin *et al.*, 2005).

### ***b) Les protéines structurales***

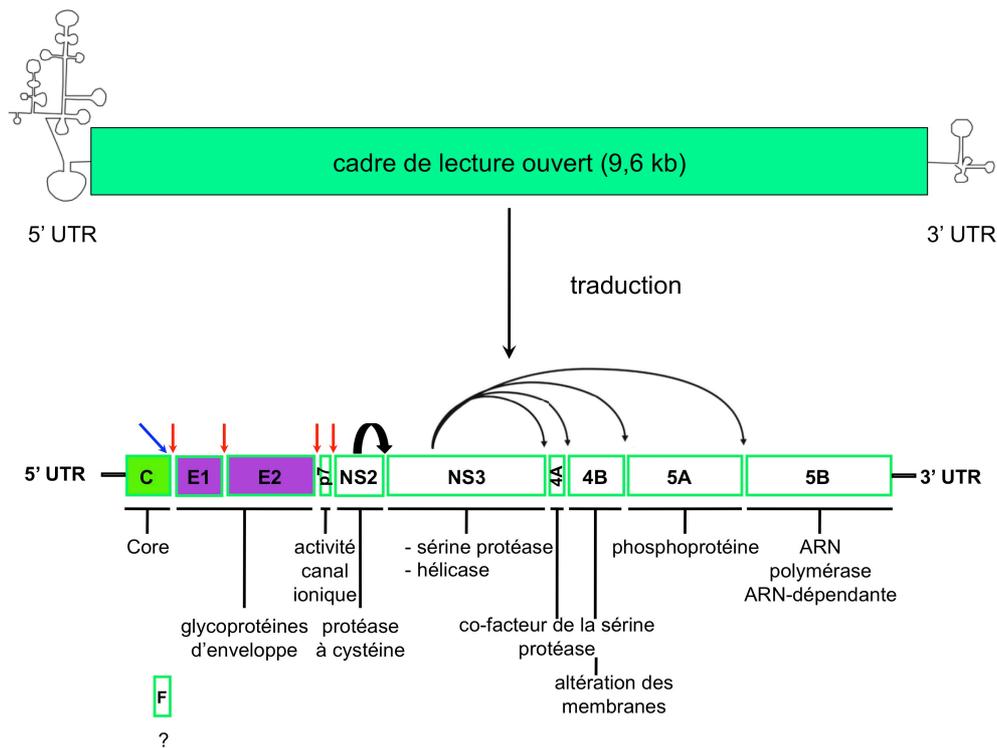
Les protéines structurales correspondent aux éléments constitutifs de la particule virale. Elles comprennent la protéine de capsid, core et les deux glycoprotéines d'enveloppe, E1 et E2.

#### **i - La protéine de capsid : core**

La protéine de capsid, core, intervient dans la formation de la nucléocapsid virale. Cette dernière renferme le matériel génétique du virus. Sa maturation et son assemblage se font en étroite association avec les membranes du ER et les LD. Après assemblage, la nucléocapsid est recouverte d'une bicouche lipidique d'origine cellulaire, résultant de son bourgeonnement au niveau de la membrane du ER. Les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 sont insérées dans cette bicouche lipidique. Par la suite, la nucléocapsid enveloppée suit les étapes tardives de maturation et de sécrétion.

La protéine core (encore appelée protéine C) est une protéine en hélices alpha de 21 kDa capable de se dimériser. Après deux clivages successifs, la forme mature de cette protéine est générée. Tout d'abord, une signal peptidase clive entre les protéines C et E1 afin de générer la forme immature de cette protéine (qui possède un poids moléculaire apparent de 23 kDa) (Santolini *et al.*, 1994).

Par la suite, une signal peptide peptidase clive le signal peptide de la protéine C, libérant ainsi la forme mature de 21 kDa (Hijikata *et al.*, 1991 ; Boulant *et al.*, 2005). La protéine core mature est composée de deux domaines : D1 et D2 (McLauchlan, 2009 ; Okamoto *et al.*, 2008). Le domaine D1 est riche en acides aminés basiques et hydrophiles. Ce domaine constitue une région d'interaction avec l'extrémité 5' UTR de l'ARN et contient des résidus essentiels pour la formation de la nucléocapsid *in vitro* (Klein *et al.*, 2005). Cependant, cette interaction n'est pas spécifique de l'ARN du HCV (Santolini *et al.*, 1994) mais repose plutôt sur la présence de motifs très structurés (Kunkel *et al.*, 2001). De plus, ce domaine interagit avec des acteurs du cytosquelette tels que la tubuline, favorisant ainsi la formation des microtubules *in vitro* mais également le transport de la nucléocapsid lors de l'entrée virale *in vivo* (Roohvand *et al.*, 2009). De plus, le domaine D1 pourrait être impliqué dans l'oligomérisation de la protéine de capsid (Nolandt *et al.*, 1997 ; Kunkel *et al.*, 2001 ; Klein *et al.*, 2004 ; Nakai *et al.*, 2006). De même, *in vitro*, la protéine de capsid se lie à la glycoprotéine E1 (Lo *et al.*, 1996 ; Ma *et al.*, 2002 ; Nakai *et al.*, 2006), un processus pouvant dépendre de l'oligomérisation de la protéine core (Nakai *et al.*, 2006).



**Figure 10. Organisation génomique du HCV.**

L'ARN génomique est constitué de deux régions non codantes (5' UTR et 3' UTR) et d'un cadre de lecture ouvert à partir duquel la polyprotéine est synthétisée. Les sites de clivage de la signal peptidase, des signal peptidases cellulaires et des protéases virales (NS2/3 et NS3/4A) sont représentés par des flèches bleue, rouges et noires, respectivement. Les protéines structurales sont sur fonds violet et vert et les protéines non structurales sur fond blanc.

Il est toutefois difficile d'imaginer comment ces interactions peuvent avoir lieu *in vivo* lors du bourgeonnement, puisque les protéines core et E1 sont situées de part et d'autre de la membrane. Enfin, certains acides aminés de ce domaine sont importants pour la formation des particules virales infectieuses à une étape post-assemblage (Alsaleh *et al.*, 2010). Le domaine D2, quant à lui, est hydrophobe. Il contient deux hélices alpha amphipathiques, séparées par une boucle hydrophobe. Ces hélices sont nécessaires à l'association de la protéine core avec les lipides membranaires (Boulant *et al.*, 2006).

De plus, la protéine de capsid est majoritairement localisée au niveau des membranes associées aux LD (Barba *et al.*, 1997 ; Rouillé *et al.*, 2006 ; Boulant *et al.*, 2007). En effet, l'interaction entre la protéine de capsid et les LD joue un rôle dans l'assemblage du HCV (voir partie II.D.4. ; pour revue (McLauchlan, 2009)). Enfin, le domaine D2 est important pour la maturation du domaine D1, sa conformation et sa stabilité (Boulant *et al.*, 2005 ; Murray *et al.*, 2007).

Des mutations dans la séquence codante pour la protéine p7 et la protéine NS2 compensant des mutants létaux de la protéine core suggèrent qu'il existe une interaction entre cette protéine et les protéines p7 et NS2, deux protéines importantes pour l'assemblage de la particule virale (Murray *et al.*, 2007).

En dépit du fait de constituer l'un des composants du virion, la protéine core possède de nombreuses autres fonctions dans le cycle viral infectieux et la pathogénèse associée au HCV. En effet, en dérégulant l'expression de certains gènes cellulaires, la protéine de capsid pourrait intervenir dans l'apoptose, la modulation de la réponse immunitaire, la prolifération cellulaire ainsi que l'altération du métabolisme lipidique et la stéatose hépatique (Nguyen *et al.*, 2006 ; Jackel-Cram *et al.*, 2007 ; Roingard and Hourieux, 2008 ; McLauchlan, 2009). Cependant, la plupart de ces résultats reposent sur l'expression ectopique de la protéine core et demandent à être confirmés dans un système infectieux.

### **ii - ARFP, une onzième protéine virale ...**

Au cours de la synthèse de la polyprotéine précurseur, une petite protéine additionnelle nommée protéine F ou ARFP pourrait être synthétisée (pour revue (Branch *et al.*, 2005)). Cette protéine de 17 kDa, serait produite par décalage du cadre ouvert de lecture (-2/+1), au niveau d'une séquence de glissement, située dans la séquence codante de la protéine de capsid (Xu *et al.*, 2001). Des anticorps anti-F, ainsi qu'une réponse immunitaire cellulaire ont été détectés chez certains patients chroniquement infectés par le HCV (Fiorucci *et al.*, 2007), suggérant que cette protéine est naturellement exprimée lors de l'infection (Xu *et al.*, 2001). Cependant, la fonction de cette protéine n'est pas clairement définie. En outre, cette protéine ne semble pas nécessaire à la réplication de l'ARN viral (McMullan *et al.*, 2007 ; Vassilaki *et al.*, 2008).

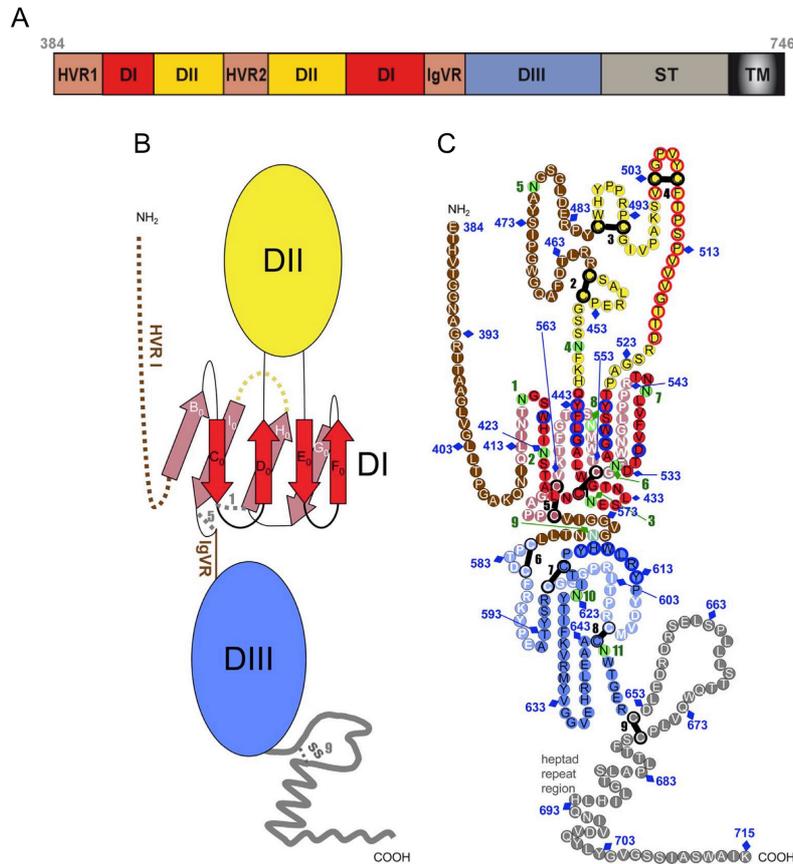
### **iii - Les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2**

Les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 du HCV sont impliquées dans le processus d'entrée et dans l'attachement du virus à la surface cellulaire. De plus, ces glycoprotéines induisent la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire suite à l'internalisation de la particule. Enfin, ces glycoprotéines jouent un rôle important dans l'assemblage, du fait de leur incorporation passive à la surface du virion et de leur implication dans le processus de bourgeonnement (Wakita *et al.*, 2005).

Les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 forment un hétérodimère non-covalent, essentiel à l'infectivité du HCV (Dubuisson *et al.*, 1994 ; Deleersnyder *et al.*, 1997 ; Bartosch

*et al.*, 2003c). De plus, la co-expression de ces deux glycoprotéines est nécessaire à leur repliement (Michalak *et al.*, 1997 ; Cocquerel *et al.*, 2003). Les formes matures des glycoprotéines E1 et E2 correspondent à des protéines membranaires de type I. En effet, elles contiennent un large ectodomaine N-terminal hautement glycosylé et un domaine C-terminal transmembranaire permettant leur ancrage à la membrane (Cocquerel *et al.*, 2000 ; Op De Beeck *et al.*, 2000 ; Ciczora *et al.*, 2007 ; Lavie *et al.*, 2007). Des signaux présents dans la partie C-terminale de la protéine de capside et dans le domaine transmembranaire de la protéine E1 sont responsables de la translocation des ectodomains de ces glycoprotéines vers le ER (Santolini *et al.*, 1994 ; Cocquerel *et al.*, 1998 ; Cocquerel *et al.*, 1999). Récemment, de nouvelles régions d'interaction entre les hétérodimères E1 et E2 ont été identifiées comme étant importantes dans le processus d'entrée du HCV (Albecka *et al.*, 2011 ; Maurin *et al.*, 2011).

La formation des ponts disulfure et la N-glycosylation sont deux aspects importants de la biogenèse de ces deux glycoprotéines. La N-glycosylation cible spécifiquement les motifs Asparagine-X-Sérine/Thréonine. Dans le système HCVpp (génotype 1a), quatre des cinq sites putatifs de glycosylation de la protéine E1 et les onze sites de glycosylation de la protéine E2 sont glycosylés (Goffard *et al.*, 2005). La conservation de ces sites, entre les différents génotypes du HCV, suggère un rôle des glycanes dans le cycle viral. En effet, l'empêchement de la glycosylation de certains de ces sites abroge l'infectivité des HCVpp (Goffard *et al.*, 2005) ou augmente la neutralisation médiée par les anticorps (Helle *et al.*, 2007 ; Helle *et al.*, 2010). De plus, les glycanes participent au repliement des protéines E1 et E2 ainsi qu'à leur hétérodimérisation (Meunier *et al.*, 1999 ; Goffard *et al.*, 2005 ; Slater-Handshy *et al.*, 2004).



**Figure 11. Modèle représentant l'ectodomain de la glycoprotéine d'enveloppe E2.**

a. Organisation des différents domaines présents sur la glycoprotéine d'enveloppe E2.

b. Représentation spatiale de l'organisation des différents domaines.

c. Description détaillée de l'organisation des résidus formant les différents domaines de E2. Les acides aminés sur fond vert représentent les sites de glycosylation. Les acides aminés cerclés de bleu jouent un rôle dans l'interaction avec CD81. Les acides aminés cerclés de rouge peuvent former un potentiel peptide de fusion.

D'après (Krey *et al.*, 2010).

Les glycoprotéines d'enveloppe du HCV sont hautement antigéniques. Le déterminant majeur étant la région HVR1 située dans la partie N-terminale de la protéine E2. En effet, l'anticorps monoclonal de rat 3/11, en reconnaissant un épitope en aval de la région HVR1 de la protéine E2, neutralise l'entrée virale (Tarr *et al.*, 2006). Ainsi, la variabilité associée à cette région pourrait permettre l'échappement du virus au système immunitaire. Cependant, la production précoce d'anticorps dirigés contre cette région est associée à la clairance virale (Allander *et al.*, 1997 ; Zibert *et al.*, 1997).

Les glycoprotéines d'enveloppe présentes à la surface des HCVpp s'assemblent dans un compartiment post-golgien (Sandrin *et al.*, 2005). Cependant, dans le système HCVcc (correspondant au virus produit en culture cellulaire ou *cell-cultured HCV*), les glycoprotéines E1 et E2 du HCV s'associent dans un compartiment dérivé du ER. Par conséquent, des différences d'oligomérisation de ces protéines ainsi que de maturation des glycanes existent (Vieyres *et al.*, 2010).

De manière intéressante, plusieurs études confortent l'implication de ces glycoprotéines dans le processus d'entrée virale. Par exemple, la glycoprotéine d'enveloppe E2 interagit avec la tétraspanine CD81 (*cluster of differentiation 81*) (Pileri *et al.*, 1998 ; Cocquerel *et al.*, 2003). De même, cette dernière, par l'intermédiaire de la région HVR1, interagit avec le récepteur SR-BI (Scarselli *et al.*, 2002 ; Callens *et al.*, 2005). Récemment, un modèle structural de la glycoprotéine d'enveloppe E2 a été proposé (Krey *et al.*, 2010) (Figure 11).

### ***c) Les protéines non structurales***

Les protéines non structurales interviennent essentiellement dans le cycle répliatif du virus.

#### **i - La protéine p7**

La protéine p7 est une petite protéine intrinsèque à la membrane du ER. Elle possède deux domaines transmembranaires liés par une petite boucle cytoplasmique chargée positivement. Ainsi, les extrémités N- et C-terminales de cette protéine font face à la lumière du ER (Carrère-Kremer *et al.*, 2002). Des formes partiellement clivées E2/p7 et p7/NS2 sont souvent observées (Carrère-Kremer *et al.*, 2002). Cependant, ces dernières ne semblent pas essentielles pour une infection productive (Jones *et al.*, 2007). *In vitro*, la protéine p7 s'associe en multimères pour former un canal ionique à cations de 42 kDa (Pavlović *et al.*, 2003 ; Griffin *et al.*, 2004 ; Luik *et al.*, 2009). Les fonctions de cette protéine ne sont pas encore bien définies. Toutefois, un rôle potentiel de cette protéine au cours de l'étape d'entrée a été décrit (Griffin *et al.*, 2008). Cependant, aucune démonstration de l'incorporation de cette dernière dans les virions n'a été montrée. De plus, cette protéine est requise pour les étapes tardives de l'assemblage viral (Steinmann *et al.*, 2007). En effet, la protéine p7 est essentielle pour la sécrétion des particules virales infectieuses en culture cellulaire (Jones *et al.*, 2007 ; Steinmann *et al.*, 2007) et dans le modèle du chimpanzé (Sakai *et al.*, 2003).

## ii - La protéine NS2

La protéine NS2 est une protéine transmembranaire de 23 kDa (Santolini *et al.*, 1995 ; Yamaga and Ou, 2002 ; Lorenz *et al.*, 2006 ; Jirasko *et al.*, 2008). Cette protéine possède une activité protéasique à cystéine (Lorenz *et al.*, 2006 ; Jirasko *et al.*, 2008 ; Schregel *et al.*, 2009).

Bien que la protéine NS2 ne soit pas essentielle à la formation du complexe de réplication du HCV (Lohmann *et al.*, 1999 ; Blight *et al.*, 2000), le clivage entre les protéines NS2 et NS3 l'est (Dentzer *et al.*, 2009). De plus, la réplication du HCV peut être bloquée par la cyclosporine A, un inhibiteur du site de clivage NS2/NS3 (Ciesek *et al.*, 2009).

De manière importante, la protéine NS2 semble impliquée dans la morphogénèse des particules virales (Jones *et al.*, 2007 ; Yi *et al.*, 2007). En effet, la protéine NS2 est impliquée dans la phosphorylation de NS5A (Liu *et al.*, 1999). Des études de transcomplémentation montrent que cette protéine virale participerait, probablement en collaboration avec la protéine NS5A, à une étape post-assemblage (Yi *et al.*, 2009). Ainsi, cette protéine semble requise pour la production des particules infectieuses (Jirasko *et al.*, 2008). De manière importante, la protéine NS2 constitue un médiateur entre les différentes protéines virales du HCV (Jirasko *et al.*, 2010 ; Ma *et al.*, 2011 ; Boson *et al.*, 2011 ; Popescu *et al.*, 2011a ; Stapleford and Lindenbach, 2011). En effet, les protéines p7 et NS2, en interagissant avec les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 et les protéines non structurales (principalement la protéine NS3) permettent la formation des sites d'assemblage (Jirasko *et al.*, 2010 ; Ma *et al.*, 2011 ; Boson *et al.*, 2011 ; Popescu *et al.*, 2011a ; Stapleford and Lindenbach, 2011).

La protéine NS2 interagit également avec des protéines cellulaires. Ainsi, en interagissant avec la protéine cellulaire CIDEB (*cell death-inducing DFF45-like effector B*), la protéine NS2 inhibe l'apoptose médiée par cette dernière (Erdtmann *et al.*, 2003).

Enfin, des sites de recombinaison importants pour l'élaboration de virus chimères intra- ou intergénomiques se situent au niveau de cette protéine (Kalinina *et al.*, 2002 ; Lindenbach *et al.*, 2005 ; Noppornpanth *et al.*, 2006 ; Pietschmann *et al.*, 2006 ; Legrand-Abravanel *et al.*, 2007 ; Morel *et al.*, 2010 ; Bhattacharya *et al.*, 2011).

## iii - La protéase NS3/4A et l'hélicase NS3

La protéine NS3 est une protéine de 69 kDa. Cette protéine possède à la fois une activité sérine protéase localisée dans sa partie N-terminale, mais également une activité hélicase/NTPase située dans sa partie C-terminale. L'activité hélicase/NTPase de la protéine

NS3 est nécessaire à l'infection *in vivo* (Kolykhalov *et al.*, 2000) et à la réplication *in vitro* (Lam and Frick, 2006). De plus, afin d'acquérir l'activité enzymatique permettant le clivage entre les jonctions NS3/NS4A, NS4A/NS4B, NS4B/NS5A et NS5A/NS5B, le domaine à activité sérine protéase de NS3 doit interagir avec la protéine NS4A (Failla *et al.*, 1994 ; Bartenschlager *et al.*, 1995). En effet, via des liaisons hydrogènes, la protéine NS4A permet de stabiliser et de structurer le domaine protéasique de la protéine NS3. Cette interaction conduit à des changements de conformation et au repositionnement du site actif de la protéine NS3 (Lin *et al.*, 1994 ; Kim *et al.*, 1996). De plus, la protéine NS4A, via son domaine N-terminal hydrophobe, participe à l'adressage de la protéine NS3 dans la membrane du ER (Wolk *et al.*, 2000 ; Moradpour *et al.*, 2005). En outre, le domaine protéasique de la protéine NS3 contient un site de fixation pour un ion zinc ( $Zn^{2+}$ ), essentiel pour la conformation du site catalytique de cette protéine (Love *et al.*, 1996). De manière intéressante, les structures tridimensionnelles des différents domaines de l'hélicase (Yao *et al.*, 1997), de la protéase (Kim *et al.*, 1996 ; Love *et al.*, 1996) ainsi que de la protéine NS3 entière (Yao *et al.*, 1999) ont été résolues.

La fonction du domaine hélicase de la protéine NS3 dans le cycle viral infectieux n'est pas clairement définie. En effet, sous forme dimérique, cette protéine peut dérouler les intermédiaires de réplication (correspondant à des ARN doubles brins), ou défaire les structures secondaires présentes sur les brins positifs ou négatifs des ARN. Toutefois, bien que cette protéine, sous forme monomérique, puisse lier l'ARN, le déroulement des duplexes d'ARN nécessite un dimère de cette dernière (Serebrov and Pyle, 2004). Ainsi, en facilitant l'accès des ARN à la polymérase NS5B, cette protéine semble participer à la réplication virale. De plus, la protéine NS3 est importante pour l'assemblage des particules virales. En effet, elle est impliquée dans la morphogénèse et l'infectiosité du virus (Yi *et al.*, 2007 ; Ma *et al.*, 2008 ; Han *et al.*, 2009). Cette protéine joue également un rôle dans l'hyperphosphorylation de la protéine NS5A (Koch and Bartenschlager, 1999 ; Lindenbach *et al.*, 2007).

Enfin, la protéase NS3/4A clive les protéines cellulaires CARDIF (encore appelée MAVS ou IPS-1 ou VISA) et TRIF qui participent aux voies de signalisation dépendantes de RIG-I et du TLR-3 (Li *et al.*, 2005a ; Li *et al.*, 2005b ; Meylan *et al.*, 2005). Ainsi, la réponse immunitaire innée dépendante de ces deux éléments est abrogée.

Ainsi, du fait de son implication dans des étapes clef du cycle viral, de son interaction avec des protéines cellulaires et puisque sa structure tridimensionnelle est connue, il est logique que la protéase virale NS3/4A ait constituée une cible de choix pour le

développement de nouvelles molécules anti-HCV (voir partie I.B.6.b.).

#### **iv - La protéine NS4B**

La protéine NS4B est une protéine de 27 kDa. L'analyse de la séquence de cette protéine permet de prédire quatre passages transmembranaires (Hügler *et al.*, 2001 ; Lundin *et al.*, 2003). Ses extrémités N- et C-terminales sont initialement cytosoliques. Cependant, une partie de l'extrémité N-terminale de la protéine NS4A peut être détectée dans la lumière du ER, suite à une réorientation post-traductionnelle (Lundin *et al.*, 2003). Ainsi, un cinquième segment transmembranaire, appelé TMX, résulterait de cet événement. D'autre part, l'extrémité C-terminale de cette protéine possède deux hélices alpha (Gouttenoire *et al.*, 2009).

De manière intéressante, l'expression de la protéine NS4B suffit à induire la formation d'un réseau membranaire auquel sont associés les complexes de réplication du HCV : le « *membranous web* » (Egger *et al.*, 2002). Ce réseau membranaire constitue une plateforme d'accumulation de toutes les protéines non structurales afin de former les complexes de réplication. Toutefois, les mécanismes impliqués dans la formation du « *membranous web* » ne sont pas encore connus. Ces derniers pourraient reposer sur la multimérisation de la protéine NS4B, ainsi que sur les interactions de cette protéine avec les autres protéines non structurales virales et avec des facteurs cellulaires. Ainsi, ces phénomènes faciliteraient la palmitoylation de la protéine NS4B (Yu *et al.*, 2006). Le rôle de la protéine NS4B dans la réplication a été prouvé en utilisant des mutants défectifs au niveau de l'activité guanosine triphosphatique (Einav *et al.*, 2004). D'autre part, des mutations dans le domaine C-terminal cytosolique de cette protéine altèrent sa localisation (Gouttenoire *et al.*, 2009 ; Jones *et al.*, 2007 ; Jones *et al.*, 2009), ainsi que sa capacité à hyperphosphoryler la protéine NS5A (Jones *et al.*, 2009). Enfin, l'utilisation d'un mutant capable d'augmenter la production virale sans affecter la réplication, laisse entendre un rôle potentiel de cette protéine dans la modulation de l'assemblage et de la sécrétion des particules virales (Jones *et al.*, 2009).

#### **v - La protéine NS5A**

La protéine NS5A est une phosphoprotéine. La forme hypophosphorylée de cette protéine possède un poids moléculaire de 56 kDa, alors qu'il est de 58 kDa pour la forme hyperphosphorylée. Cette protéine est composée de trois domaines (Tellinghuisen *et al.*, 2004 ; Moradpour *et al.*, 2005). La région N-terminale du domaine I consiste en une hélice alpha amphipathique, responsable de l'ancrage de la protéine dans la membrane du ER

(Brass *et al.*, 2002). Ce domaine peut s'associer avec les LD (Miyanari *et al.*, 2007). De plus, ce dernier est composé de deux sous-domaines : le sous-domaine IA, riche en acides aminés basiques et contenant un site de liaison au zinc et le sous-domaine IB, majoritairement basique. De manière intéressante, la réplication virale est inhibée si des mutations présentes au sein de ce domaine, perturbent l'ancrage à la membrane (Elazar *et al.*, 2003 ; Penin *et al.*, 2004) ou affectent le domaine de liaison au zinc (Tellinghuisen *et al.*, 2004) de cette protéine. L'intégralité du domaine I de cette protéine a été cristallisé (Tellinghuisen *et al.*, 2005). L'homodimérisation de la protéine NS5A via les sous-domaines IA conduirait à la formation d'un sillon basique au niveau du sous-domaine IB, permettant ainsi la liaison de cette protéine avec l'ARN (Tellinghuisen *et al.*, 2005). De plus, la protéine NS5A possède une grande affinité pour le motif poly(U/UC) présent au niveau de la région 3' UTR de l'ARN viral (Huang *et al.*, 2005).

Les fonctions des domaines II et III de cette protéine sont peu décrites. Toutefois, le domaine II contient des résidus essentiels pour la réplication (Tellinghuisen *et al.*, 2008) et ce, malgré sa capacité à tolérer de larges insertions ou délétions (Appel *et al.*, 2005 ; Liu *et al.*, 2006 ; Tellinghuisen *et al.*, 2008). Le domaine III, quant à lui, semble jouer un rôle important dans l'assemblage des nouveaux virions (Appel *et al.*, 2008 ; Masaki *et al.*, 2008). En effet, la phosphorylation d'un résidu sérine au sein de ce domaine augmente la production virale (Tellinghuisen *et al.*, 2008). Cependant, la phosphorylation de NS5A ne semble pas indispensable à la réplication de l'ARN en système cellulaire. Par ailleurs, une corrélation inverse entre le degré d'hyperphosphorylation de NS5A et la réplication de l'ARN a été montrée (Appel *et al.*, 2005). De plus, la réplication génomique du HCV est augmentée dans des cellules portant un réplicon non-adapté et traitées par un inhibiteur de la kinase responsable de l'hyperphosphorylation de NS5A (Neddermann *et al.*, 2004). D'autre part, l'hyperphosphorylation de la protéine NS5A semble être influencée par l'activité traductionnelle de l'ARN génomique du virus. Ainsi, la diminution de la traduction de réplicons subgénomiques entraîne une réduction de l'hyperphosphorylation de NS5A (McCormick *et al.*, 2006). Néanmoins, il semblerait qu'il existe une corrélation entre la capacité de NS5A à se dimériser et à lier l'ARN et la réplication du HCV (Lim *et al.*, 2012).

Enfin, les protéines NS5A et NS5B interagissent et cette interaction est importante pour la réplication de l'ARN (Shimakami *et al.*, 2004). Différents partenaires cellulaires de la protéine NS5A ont été décrits. De plus, il a été suggéré que cette phosphoprotéine virale soit impliquée dans la résistance au traitement par l'IFN (Polyak *et al.*, 2001 ; Lan *et al.*, 2007). En effet, la protéine NS5A, en empêchant la phosphorylation de la protéine cellulaire

STAT1, interfère avec la voie de signalisation de l'IFN de type 1 (Kumthip *et al.*, 2012). Ainsi, cette protéine est impliquée dans la modulation de la réponse immunitaire de l'hôte dirigée contre le HCV.

#### vi - La protéine NS5B

La protéine NS5B est une protéine membranaire de 68 kDa. Cette protéine assure la fonction d'ARN polymérase ARN-dépendante. Le motif Glycine-Acide aspartique-Acide aspartique (GDD), caractéristique de ces enzymes (Poch *et al.*, 1989 ; Lohmann *et al.*, 1997), est présent au sein de la protéine NS5B. L'ancrage de cette protéine à la membrane du ER a lieu post-traductionnellement via son extrémité C-terminale. Cette association à la membrane est importante pour la réplication de l'ARN du HCV (Lee *et al.*, 2004 ; Moradpour *et al.*, 2004b). *In vivo*, il semblerait que la protéine NS5B initie une synthèse d'ARN *de novo* (Zhong *et al.*, 2000) à partir d'une base purine (Shim *et al.*, 2002).

La structure tridimensionnelle de cette protéine révèle une forme de main droite avec des « doigts », une « paume » et un « pouce » (Bressanelli *et al.*, 1999 ; Lesburg *et al.*, 1999 ; Bressanelli *et al.*, 2002). Le domaine en forme de « paume » contient le site actif enzymatique alors que les « doigts » et le « pouce » forment un tunnel par lequel l'ARN est mené au site actif. Les nucléotides nécessaires à l'élongation de l'ARN en cours de synthèse, arrivent au niveau du site actif, en passant par un second tunnel chargé positivement. Cette protéine a été cristallisée en association avec divers inhibiteurs (Wang *et al.*, 2002 ; Biswal *et al.*, 2005 ; Biswal *et al.*, 2006).

Enfin, l'activité de la protéine NS5B est modulée par divers facteurs de l'hôte. Par exemple, les protéines NS5A et NS5B interagissent avec les protéines VAP-A (*vesicle-associated membrane protein-associated protein*) et VAP-B. Ces interactions sont importantes pour l'étape de réplication de l'ARN génomique du virus (Tu *et al.*, 1999 ; Gao *et al.*, 2004 ; Hamamoto *et al.*, 2005). De plus, la phosphorylation de la protéine NS5B par la PKR cellulaire augmente également la réplication virale (Kim *et al.*, 2004).

### C. Modèles d'étude

Afin de mettre en exergue les nombreuses questions associées à la pathogenèse associée au HCV, de nombreuses recherches ont été menées. Cependant, jusqu'en 2005, l'absence d'un système de culture cellulaire permettant l'amplification de ce virus a

compliqué cette tâche. Néanmoins, grâce au développement de nombreux outils de substitution, diverses découvertes ont été réalisées.

## 1) Les modèles d'étude de l'infection par le virus de l'hépatite C

### a) *Le modèle simien : le chimpanzé*

L'homme est l'hôte naturel du HCV. Toutefois, expérimentalement, le chimpanzé peut être infecté de manière stable et reproductible par ce virus. Cependant, la progression de la maladie chez les chimpanzés est différente de celle observée chez l'homme. En effet, les niveaux de chronicité sont moins élevés chez ces animaux et ils ne développent ni fibrose, ni cirrhose hépatiques. Néanmoins, le chimpanzé représente une alternative afin d'étudier la pathogenèse associée au HCV (pour revue (Bukh, 2004)). En 1989, ce modèle animal a permis l'identification du HCV (voir partie II.A.) ainsi que le développement de nombreux tests diagnostiques. Cependant, pour des raisons éthiques, économiques et écologiques, l'utilisation de cet animal est régie. De plus, l'interprétation des expériences réalisées sur des chimpanzés est parfois discutée étant donné le nombre restreint d'animaux enrôlés par étude. Néanmoins, chez cet animal, une virémie persistante s'établit et une réponse immunitaire se développe malgré quelques divergences avec l'homme (Walker, 1997 ; Bassett *et al.*, 1998 ; Elmowalid *et al.*, 2007 ; Youn *et al.*, 2008 ; Zubkova *et al.*, 2009). De plus, le chimpanzé a apporté de nombreuses données concernant la phase aigüe de l'hépatite C. En effet, chez l'homme, l'absence de manifestations cliniques ne permet pas le diagnostic de cette phase. Enfin, de nombreuses drogues ciblant les protéases ou la polymérase virales ont également été testées chez cet animal. Cependant, des différences notables existent entre ce modèle animal et l'homme. Par exemple, les chimpanzés ne répondent pas à la bithérapie standard composée d'IFN- $\alpha$  (Lanford *et al.*, 2007 ; pour revue MacArthur *et al.*, 2012 ; pour revue Carcamo and Nguyen, 2012).

### b) *Les modèles murins*

De nombreux modèles murins ont été développés afin d'étudier le cycle viral du HCV. En effet, l'utilisation de ces petits animaux est plus facile, moins contraignante et moins coûteuse que celle du chimpanzé.

Le modèle murin le plus relevant correspond à la souris uPA/SCID (*albumin-urokinase-type plasminogen activator* pour Alb-uPA et *severe combined immunodeficiency* pour SCID). Brièvement, le foie de souris transgéniques Alb-uPA, détruit suite à l'expression du transgène activateur du plasminogène de type urokinase, est ensuite

recolonisé par des cellules hépatiques humaines (pour revue Meuleman and Leroux-Roels, 2008). Cependant, l'expression de ce transgène chez ces souris est associée à une forte toxicité. De ce fait, ces souris présentent une forte dégénérescence hépatique. C'est pourquoi ces souris transgéniques Alb-uPA ont été croisées avec des souris immunodéficientes (les souris SCID), afin d'obtenir un modèle murin pouvant tolérer une xénotransplantation d'hépatocytes humains (les souris uPA/SCID). De manière intéressante, le foie de ces souris, inoculé avec le sérum de patients positifs pour le HCV, présente des infections virales prolongées (Mercer *et al.*, 2001 ; Meuleman *et al.*, 2005). De plus, des titres infectieux de  $10^6$  à  $10^7$  IU/ml (Meuleman and Leroux-Roels, 2008) sont observés chez ces souris. Toutefois, l'obtention de telles souris relève d'un grand challenge technique. En effet, malgré la considération de divers facteurs afin d'optimiser leur obtention, des variations subsistent d'un animal à l'autre (Vanwolleghem *et al.*, 2010). De plus, l'immunodéficiência associée à ces souris ne permet pas d'étudier les réponses immunitaires, ni de réaliser des recherches concernant les vaccins préventifs. Ainsi, afin de palier à cette immunodéficiência, des croisements entre des souris possédant un foie humanisé et des souris possédant un système hématolymphoïde humain sont en cours d'étude. De plus, la greffe de cellules souches hématopoïétiques progénitrices humaines dans des souris SCID pourrait conduire à la reconstitution d'un système immunitaire humain. Ainsi, ce modèle pourrait permettre l'étude des différents aspects associés à l'infection par le HCV. Cependant, la mise en place d'un tel modèle reste difficile (pour revue (Legrand *et al.*, 2009)).

Les problèmes associés aux souris xénotransplantées peuvent être dépassés en utilisant des souris immunocompétentes. En effet, les souris génétiquement humanisées, exprimant les facteurs d'entrée CD81 et occludine (OCLDN) humains sont permissives à l'infection par le HCV, *in vitro* (Dorner *et al.*, 2011 ; Dorner *et al.*, 2012). Cependant, le HCV ne se réplique pas de manière efficace dans les cellules murines. En effet, il est possible qu'une incompatibilité entre la machinerie de réplication virale et les facteurs cellulaires murins existe. De plus, une réponse antivirale innée se développe chez ce modèle animal. De même, l'infection des cellules murines avec des adénovirus exprimant chacun des facteurs créer un environnement comparable à celui obtenu suite à un traitement avec de l'IFN- $\alpha$ , ce qui pourrait contrer la réplication virale au sein des cellules murines.

## **2) Les modèles cellulaires**

Trois outils majeurs ont permis de grandes avancées pour la recherche sur le HCV. Tout d'abord, les particules rétrovirales pseudotypées avec les glycoprotéines d'enveloppe du

HCV permettent d'étudier l'entrée du virus dans la cellule. Ensuite, les réplicons qui miment l'étape de réplication virale. Enfin, le virus produit en culture cellulaire qui récapitule la totalité du cycle viral.

***a) Les cellules infectées par le virus de l'hépatite C isolé de sera de patients***

Afin d'établir un système de culture cellulaire supportant la réplication du HCV, les chercheurs ont isolés et cultivés des hépatocytes primaires issus de patients chroniquement infectés par le HCV. De manière intéressante, ces cellules permettent la réplication du HCV et la production de particules virales infectieuses (Ito *et al.*, 1996). De même, des cultures d'hépatocytes primaires humains ou simiens sont infectables par le HCV et sont capables de répliquer efficacement ce virus (Lanford *et al.*, 1994 ; Fournier *et al.*, 1998 ; Rumin *et al.*, 1999 ; Castet *et al.*, 2002). Ainsi, ces modèles reflètent de manière fidèle les conditions d'une infection virale *in vivo*. Toutefois, du fait d'une réplication et d'une propagation virales très faibles, l'amplification du virus reste limitée. De plus, les résultats obtenus avec ces modèles ne sont pas reproductibles.

Afin d'amplifier le virus, des cellules mononuclées provenant du sang de patients chroniquement infectés ont été cultivées (Müller *et al.*, 1993). De même, des cellules naïves mononuclées ont été infectées avec des sera de patients (Cribier *et al.*, 1995). Ces modèles cellulaires ont permis de montrer une réplication du virus au sein de ces cellules. Cependant, la production virale étant trop faible, ce modèle n'a pu servir à l'étude du cycle viral. Néanmoins, les cultures de cellules primaires présentent des contraintes techniques et logistiques non-négligeables. Par conséquent, afin de palier à ces inconvénients, d'autres lignées cellulaires ont été utilisées afin d'étudier la propagation du HCV. C'est ainsi que les lignées hépatocytaires PH5CH et Huh-7 ainsi que les lignées lymphocytaires T (MOLT-4 et MT-2) et B (Daudi) se sont révélées sensibles et permissives à l'infection par le HCV (Shimizu *et al.*, 1992 ; Hijikata *et al.*, 1995 ; Kato *et al.*, 1995 ; Seipp *et al.*, 1997).

***b) Les pseudovirions du virus de l'hépatite C et les virosomes***

En l'absence d'un système de culture efficace, différentes méthodes ont été développées afin de produire du matériel particulaire avec les protéines du HCV. Des baculovirus recombinants, exprimant l'ensemble des protéines structurales du virus ont permis de produire, en cellules d'insectes, du matériel particulaire ressemblant à des particules du HCV (*virus-like particle* ou VLP) (Baumert *et al.*, 1998). De plus, des virus pseudotypés correspondant au virus de la stomatite vésiculaire (*vesicular stomatitis virus* ou

VSV) exprimant des glycoprotéines recombinantes du HCV ont été générés (Lagging *et al.*, 1998 ; Matsuura *et al.*, 2001 ; Buonocore *et al.*, 2002). Enfin, la production de virosomes consistant en l'incorporation des glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 au sein de vésicules lipidiques de type liposomes a constitué une autre approche (Lambot *et al.*, 2002). Toutefois, ces différents matériels particuliers sont peu ou pas infectieux. De plus, ils sont difficiles à produire et sont constitués par des glycoprotéines d'enveloppe n'étant probablement pas dans un état mature. Ainsi, plusieurs fonctionnalités essentielles au cours du cycle viral infectieux, associées à la maturation de ces dernières, ne sont pas accessibles.

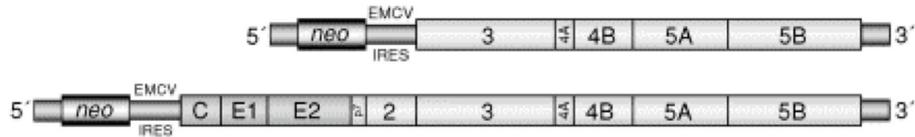
### *c) Les réplicons*

Les réplicons sont des unités autonomes de réplication de l'ARN qui miment l'étape de réplication de l'ARN viral du HCV. Les régions 5' et 3' du HCV, situées aux extrémités de ces constructions, ainsi que les protéines non structurales du virus, dictent la réplication de ces dernières. De plus, la présence d'un marqueur de sélection au sein de ces constructions, confère un avantage sélectif aux cellules les répliquant de manière efficace. Ainsi, il existe deux types de réplicons : les réplicons sous-génomiques et les réplicons génomiques (Figure 12). Pour les réplicons sous-génomiques, seule une partie de l'ORF du HCV est conservée. Elle comprend les protéines non structurales NS2 à NS5B ou les protéines NS3 à NS5B. Pour les réplicons génomiques, la polyprotéine virale est retrouvée dans son intégralité (Ikeda *et al.*, 2002 ; Pietschmann *et al.*, 2002). Cependant, la production de particules virales infectieuses (excepté pour le clone JFH-1) n'est pas permise avec ces derniers. De plus, il existe des réplicons monocistroniques et des réplicons bicistroniques. Pour les réplicons monocistroniques, la séquence codant les protéines non structurales est sous la dépendance d'un site de clivage protéolytique. En revanche, pour les réplicons bicistroniques, le marqueur de sélection est placé sous le contrôle de l'IRES du HCV, tandis que la séquence codant pour les protéines non structurales de ce virus est placée sous le contrôle d'un IRES hétérologue (par exemple, l'IRES du virus de l'encéphalomyocardite (*encephalomyocarditis virus* ou EMCV)) (Lohmann *et al.*, 1999).

De manière intéressante, les réplicons ont permis :

- de sélectionner des mutations d'adaptation qui augmentent de manière significative la réplication du génome viral (Blight *et al.*, 2000 ; Krieger *et al.*, 2001)
- d'étudier et de visualiser les complexes de réplication (Moradpour *et al.*, 2004a)
- d'étudier et de découvrir de nouvelles molécules anti-HCV (Huang *et al.*, 2008)
- de sélectionner des lignées cellulaires plus permissives à la réplication virale et produisant

des particules virales infectieuses (Blight *et al.*, 2002).



**Figure 12. Représentation schématique des réplicons du HCV.**

Les réplicons sont constitués d'une séquence d'ARN codant pour un marqueur de sélection (ici, le gène de résistance à la néomycine, *neo*). Ce gène est sous la dépendance de l'IRES du HCV. Une séquence codant tout (réplicon génomique, schéma du haut), ou une partie des protéines du HCV (réplicon sous-génomique, schéma du bas), est placée sous la dépendance de l'IRES de l'EMCV. Ces séquences codantes sont encadrées par les régions 5' et 3' UTR du HCV.

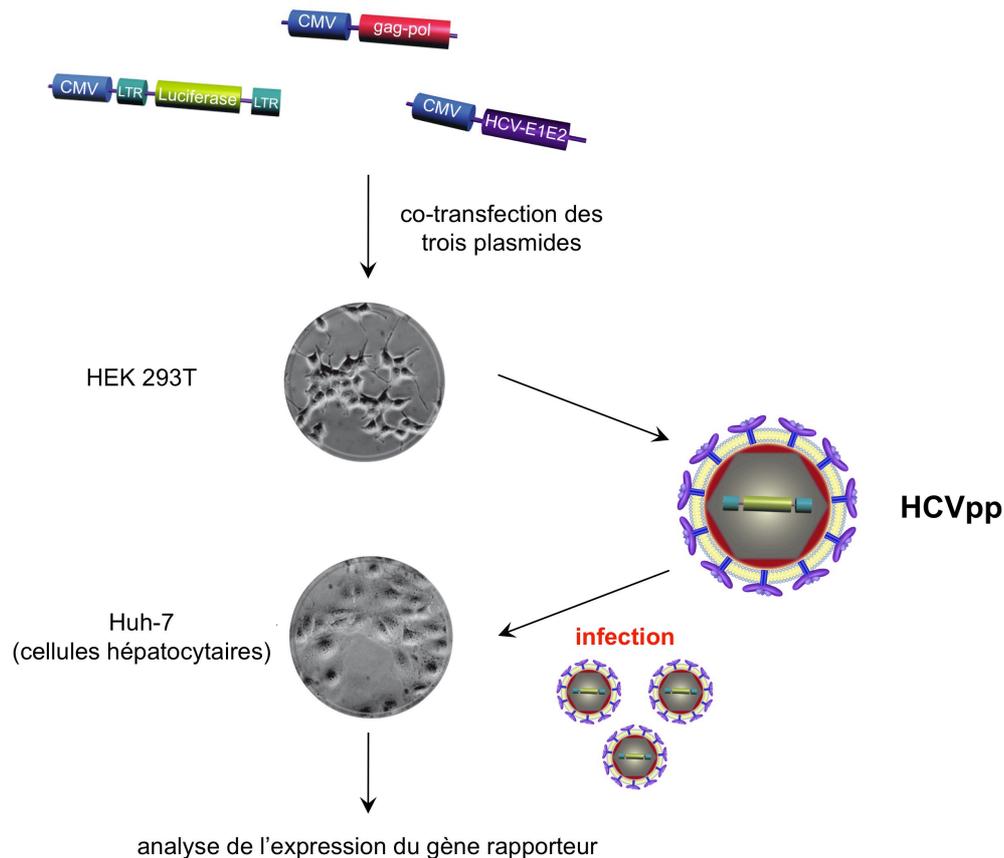
D'après (Bartenschlager *et al.*, 2003).

#### ***d) Les particules rétrovirales pseudotypées avec les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2***

Les particules rétrovirales pseudotypées avec les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 du HCV (HCVpp) ont été mises au point en 2003 (Bartosch *et al.*, 2003c ; Drummer *et al.*, 2003 ; Hsu *et al.*, 2003). Les HCVpp sont produites après co-transfection de trois vecteurs dans une lignée de cellules embryonnaires de rein humain transformées par la région précoce de l'adénovirus 5 et exprimant l'antigène T du virus SV40 (*simian virus 40*), les cellules HEK-293T (Figure 13). Le premier vecteur exprime un mini-génomme rétroviral recombinant contenant un gène rapporteur codant pour la luciférase ou pour la protéine fluorescente verte, la GFP (pour *green fluorescent protein*), ainsi que des séquences rétrovirales nécessaires pour la transcription inverse et l'intégration du gène rapporteur dans le génome de la cellule infectée. Le deuxième vecteur, exprime les protéines codées par les gènes *gag* et *pol* d'un rétrovirus (par exemple, les gènes du rétrovirus HIV ou ceux du virus de la leucémie murine (*murine leukemia virus* ou MLV)) et est responsable de la formation de la capsid. Enfin, le troisième vecteur code pour les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 du HCV. La surexpression de ces dernières induit leur incorporation à la surface des particules rétrovirales grâce à leur exportation vers la membrane cellulaire (Bartosch *et al.*, 2003c ; Hsu *et al.*, 2003) mais aussi grâce à la capacité des rétrovirus à bourgeonner à partir des membranes internes de la cellule (Sandrin *et al.*, 2005). *In fine*, les pseudoparticules sont sécrétées dans le milieu de culture cellulaire. Par la suite, elles sont récoltées afin de transduire diverses cellules. Ce

phénomène est médié par les glycoprotéines d'enveloppe présentes à la surface des HCVpp. Le génome rétroviral recombinant, encapsidé dans la nucléocapside rétrovirale, est intégré dans le génome des cellules infectées. Ainsi, les HCVpp permettent d'étudier spécifiquement l'entrée virale résultant des propriétés d'attachement et de fusion médiées par les protéines d'enveloppe du HCV. Enfin, l'infection peut être quantifiée en mesurant l'expression du gène rapporteur. En effet, les HCVpp étant déficientes pour la réplication, il est alors aisé de quantifier un cycle unique d'infection.

Les HCVpp peuvent infecter différentes lignées cellulaires hépatiques (Bartosch *et al.*, 2003c ; Hsu *et al.*, 2003 ; Lavillette *et al.*, 2005a). De plus, l'entrée médiée par les glycoprotéines d'enveloppe du HCV peut être bloquée par des anticorps anti-E1 et anti-E2 spécifiques (Bartosch *et al.*, 2003c ; Bartosch *et al.*, 2003b ; Hsu *et al.*, 2003). De même, des HCVpp possédant à leur surface des glycoprotéines dérivées de tous les génotypes viraux peuvent être générées (Lavillette *et al.*, 2005a ; Owsianka *et al.*, 2005). De plus, la génétique inverse a été utilisée afin de déterminer les domaines fonctionnels des glycoprotéines d'enveloppe du HCV (Callens *et al.*, 2005 ; Owsianka *et al.*, 2006 ; Ciczora *et al.*, 2007 ; Helle *et al.*, 2007). Ce système a également permis de caractériser la fonctionnalité des hétérodimères E1/E2 (Flint *et al.*, 2004 ; Op De Beeck *et al.*, 2004). Cependant, les HCVpp ne reflètent pas de manière fidèle le modèle du HCV dans les lignées cellulaires non-hépatiques. En effet, il est probable que l'association entre les HCVpp et les lipoprotéines n'ait pas lieu. Néanmoins, malgré la récente découverte d'un système de culture cellulaire permettant d'amplifier le HCV (voir partie II.C.2.e.), les HCVpp restent un outil important afin d'étudier la fonction des glycoprotéines E1 et E2 dans le processus d'entrée du HCV dans un système ne dépendant ni de la réplication, ni de l'assemblage du HCV.



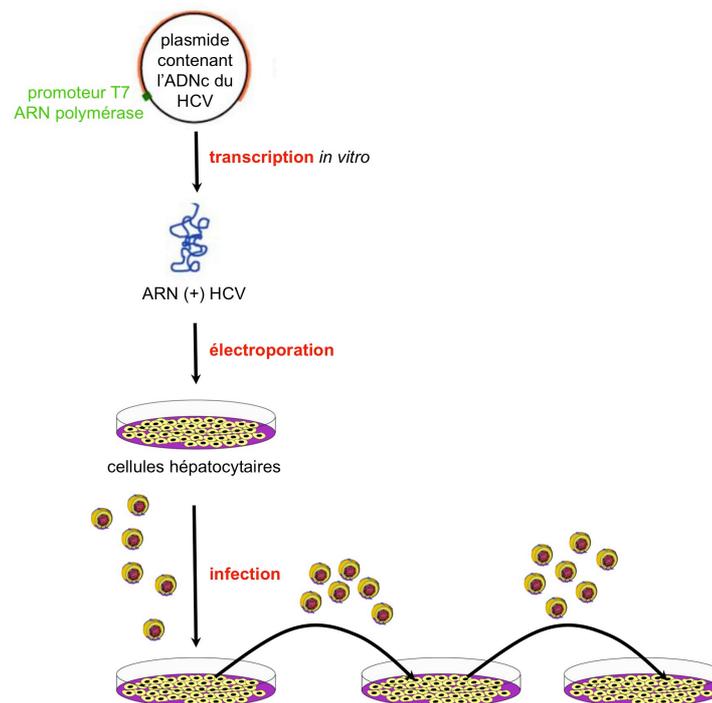
**Figure 13. Représentation schématique du système de production des particules rétrovirales pseudotypées avec les glycoprotéines d'enveloppe du HCV (HCVpp).**

Les cellules HEK-293T sont transfectées avec trois plasmides différents (se référer au texte principal). L'expression de ces trois plasmides est sous le contrôle du promoteur du cytomégalovirus (CMV). Les HCVpp sont sécrétées dans le surnageant de culture des cellules HEK-293T et sont utilisées pour infecter des cellules hépatocytaires telles que les cellules Huh-7. Les cellules infectées intègrent le gène rapporteur dans leur génome. L'expression de ce gène permet de quantifier l'infectiosité des HCVpp.

#### *e) Les particules virales produites en culture cellulaire*

Pour la première fois, en 2005, le HCV a été produit en culture cellulaire (HCVcc) (Lindenbach *et al.*, 2005 ; Wakita *et al.*, 2005 ; Zhong *et al.*, 2005). Un ARN, isolé d'un patient japonais souffrant d'une hépatite fulminante (JFH-1), a montré des capacités répliquatives en culture cellulaire. Dans un premier temps, un réplicon de génotype 2a, basé sur la souche JFH-1, a été développé. Ce dernier se répliquait de manière efficace dans les cellules Huh-7 sans mutations d'adaptation (Kato *et al.*, 2003). En 2005, l'ADN complémentaire de l'ARN génomique de cette souche virale a été cloné dans un vecteur permettant sa transcription (*in vitro*). Après transcription *in vitro*, cet ARN est

électroporé dans des cellules Huh-7. *In fine*, des virus infectieux sont produits. Ces derniers sont capables d'infecter des cellules naïves (Figure 14). Afin d'améliorer le titre viral des HCVcc, des cellules Huh-7 déficientes dans certaines voies de l'immunité telles que les cellules Huh-7.5 (Lindenbach *et al.*, 2005) ou les cellules Huh-7.5.1 (Zhong *et al.*, 2005) peuvent être utilisées. De plus, le titre viral de la souche JFH-1 peut être amélioré en réalisant des infections successives sur des cellules naïves (Zhong *et al.*, 2005 ; Delgrange *et al.*, 2007). De même, la confluence des cellules lors de l'infection semble influencer la cinétique et l'efficacité de sécrétion des nouveaux virions (Koutsoudakis *et al.*, 2006).



**Figure 14. Représentation schématique de la production du virus de l'hépatite C en culture cellulaire (HCVcc).**

L'ARN viral, transcrit à partir de l'ADN complémentaire (ADNc) du génome viral, est électroporé dans des cellules hépatocytaires. Les cellules électroporées produisent des particules HCVcc qui sont récoltées et utilisées pour infecter de nouvelles cellules hépatocytaires. Ce modèle permet l'étude complète du cycle viral et l'amplification d'un stock viral par des infections successives.

En outre, d'autres génotypes viraux sont également produits grâce à ce système. Ainsi, un génotype 1a complet reconstitué (Yi *et al.*, 2006), présentant des mutations d'adaptation, a généré de faibles rendements de production ainsi que des titres viraux faibles et variables. De même, une production virale a été mise en évidence avec des souches virales de génotypes 1b et 2a (Yi *et al.*, 2006 ; Kato *et al.*, 2007 ; Pietschmann *et al.*, 2009 ; Yi and Lemon, 2009).

Des virus chimères contenant la région codant pour les protéines non structurales du virus JFH-1 ont été générées (Lindenbach *et al.*, 2005 ; Pietschmann *et al.*, 2006 ; Jensen *et al.*, 2008 ; Scheel *et al.*, 2008 ; Gottwein *et al.*, 2009). Cependant, ces constructions reposent sur des mutations de compensation. De plus, afin de générer un virus chimère, il est important de prendre en considération le site de jonction entre les protéines structurales et les protéines non structurales. Ainsi, pour la plupart des constructions chimères, les jonctions optimales se situent juste après le premier segment transmembranaire de la protéine NS2 (Pietschmann *et al.*, 2006). Actuellement, certaines chimères se propagent de manière plus efficace que le clone JFH-1 d'origine (Lindenbach *et al.*, 2005). Par conséquent, l'élaboration de chimères intra- et intergénomiques est importante afin d'identifier les déterminants responsables de l'efficacité de la production virale.

De manière générale, les HCVcc infectent les cellules Huh-7, les hépatocytes primaires, les chimpanzés et les souris uPA/SCID (Lindenbach *et al.*, 2006). Ainsi, ce système, *in vitro*, permet de suivre de manière continue une infection. Toutefois, il faut noter que lors d'une infection chronique, des variants viraux possédant des capacités d'entrée et de réplication plus avantageuses que celles du virus sauvage peuvent émerger. De plus, des cellules résistantes à l'infection ont été observées. Par conséquent, au cours d'une infection persistante, des mécanismes d'adaptation cellulaires et viraux sont mis en place afin d'assurer la pérennité de chacun (Zhong *et al.*, 2006).

Le virus produit en culture cellulaire présente des propriétés comparables au virus issu du sérum de patients. Toutefois, il semble que les particules HCVcc intracellulaires présentent une densité d'environ 1,15 g/ml, alors que les particules HCVcc sécrétées possèdent une densité comprise entre 1,05 et 1,15 g/ml (Gastaminza *et al.*, 2006 ; Lindenbach *et al.*, 2006) suggérant des différences au niveau des propriétés virales de ces particules. Néanmoins, le caractère lipoprotéique du HCVcc a été confirmé (Gastaminza *et al.*, 2008 ; Gastaminza *et al.*, 2010). De manière importante, l'infectivité spécifique des particules HCVcc est faible. En effet, seule une particule infectieuse est produite pour mille génomes équivalents.

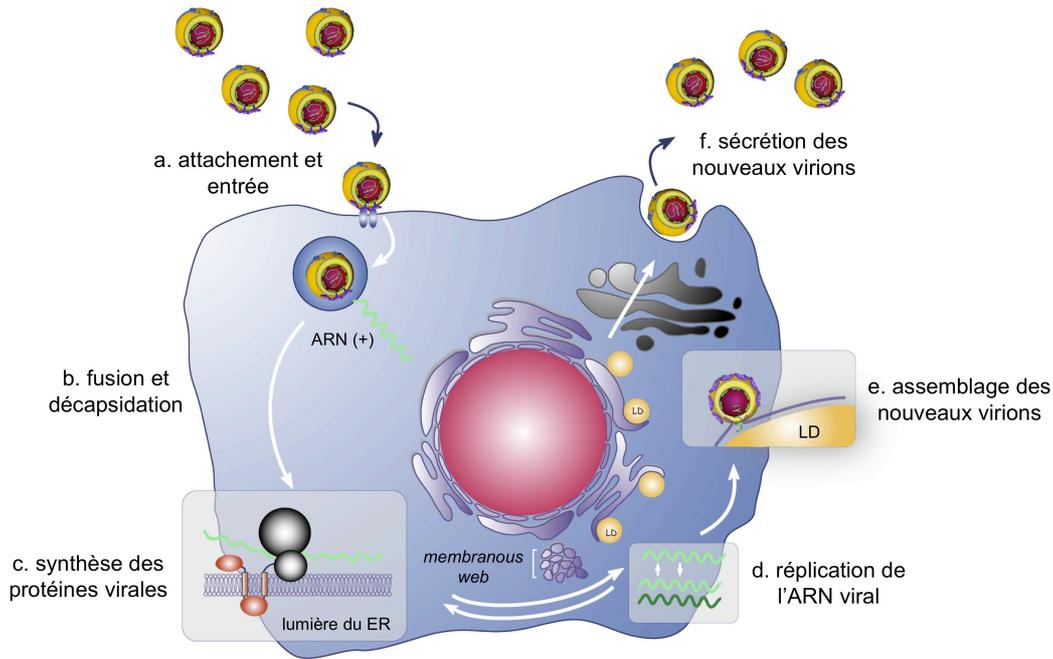
Pour conclure, le clone JFH-1 est unique par plusieurs aspects. Tout d'abord, ce clone est capable de se répliquer dans des cellules sans mutations d'adaptation. Ensuite, ce dernier donne lieu à une production virale. Enfin, il a été isolé d'un patient souffrant d'une hépatite fulminante qui en a guéri. Ainsi, de nos jours, le système HCVcc représente le meilleur modèle afin d'étudier les différentes étapes du cycle viral infectieux du HCV et est très largement utilisé dans les laboratoires travaillant sur ce pathogène.

### ***f) Les hépatocytes primaires humains***

Enfin, les cultures d'hépatocytes primaires humains sont de plus en plus utilisées. Des hépatocytes sont isolés de tissus de foie, d'apparence normale (provenant de patients séronégatifs pour le HCV et pour les autres virus hépatiques), ayant subi une hepatectomie partielle, dans le cadre de traitement de métastases (Podevin *et al.*, 2010). Les hépatocytes primaires sont maintenus en culture cellulaire dans des conditions permettant l'expression de gènes spécifiquement exprimés par les hépatocytes, ainsi que les fonctions physiologiques de ces derniers. Ce modèle *in vitro* est donc très proche du contexte *in vivo*. Ainsi, les hépatocytes primaires permettent la réalisation du cycle infectieux complet du HCV (de différents géotypes), produit dans le système HCVcc ou dans ces mêmes hépatocytes primaires. Cependant, des difficultés associées à la culture cellulaire des hépatocytes primaires, ainsi qu'à la qualité et à la variabilité intra- et interindividuelles des hépatocytes restreint leur utilisation. De plus, ce système est très coûteux et n'est souvent accessible qu'aux institutions cliniques.

### **D. Le cycle viral infectieux du virus de l'hépatite C**

La présence d'une enveloppe virale dicte les étapes d'entrée et d'assemblage du HCV. Et, comme la plupart des virus à ARN positif, le HCV se réplique en association étroite avec les membranes. Ainsi, la figure 15 résume le cycle viral infectieux du HCV.



**Figure 15. Cycle viral putatif du HCV.**

a. Le virus est capturé par différents facteurs non-spécifiques présents à la surface cellulaire. Ensuite, la particule virale est dirigée vers des facteurs d'entrée spécifiques. Puis, le virus est internalisé par une voie d'endocytose dépendante de la clathrine.

b. Par la suite, la fusion de l'enveloppe virale avec une membrane endosomale libère l'ARN viral dans le cytoplasme de la cellule.

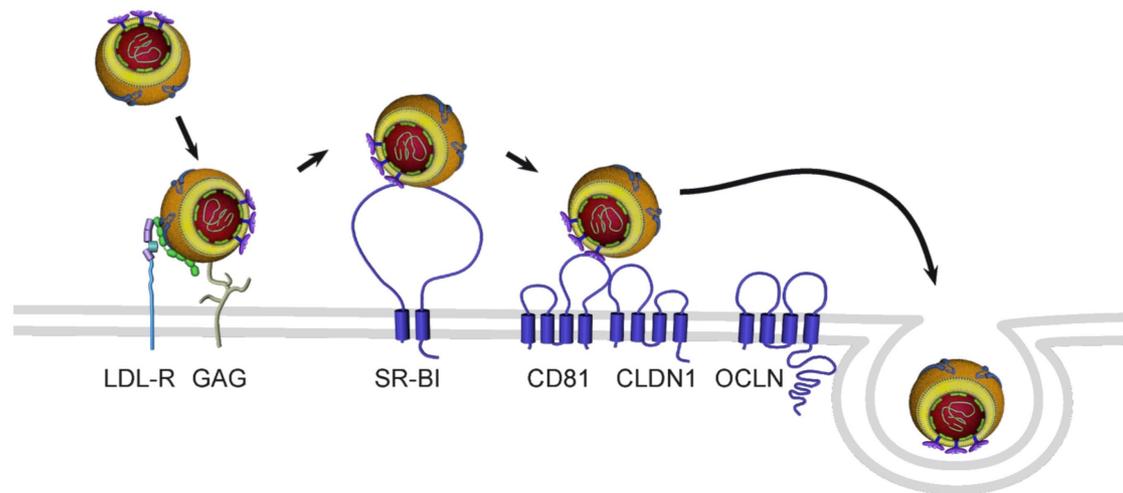
c. Puis, cet ARN génomique est traduit en une polyprotéine unique qui sera clivée co- et post-traductionnellement afin de générer les dix protéines virales. Ainsi, les protéines non structurales vont former les complexes de réplication nécessaires à l'amplification et à la réplication de l'ARN.

d. Les protéines structurales et l'ARN génomique viral, quant à eux, vont s'assembler pour former de nouveaux virions qui seront vraisemblablement relargués via la voie de sécrétion classique (e.).

Adapté de (Popescu and Dubuisson, 2010).

### 1) Le processus d'entrée virale

De nombreux facteurs impliqués dans le processus d'entrée du HCV ont été décrits (Figure 16). Leur présence ainsi que leur niveau d'expression détermine le tropisme cellulaire de ce virus. Dans un premier temps, des facteurs cellulaires non spécifiques tels que les glycosaminoglycanes (GAG) et le récepteur des lipoprotéines de faible densité (*low-density lipoprotein receptor* ou LDL-R) capturent le virus présent à la surface cellulaire. Par la suite, d'autres facteurs spécifiques interviennent dans les étapes actives de l'entrée. Néanmoins, avant de rentrer dans les hépatocytes, les virions circulants, présents dans le sang, doivent traverser la barrière sinusoïdale (voir Figure 1).



**Figure 16. Modèle du mécanisme d'entrée du HCV dans les hépatocytes.**

Le mécanisme d'entrée du virus dans l'hépatocyte est un processus complexe faisant intervenir différentes étapes. Tout d'abord, le virus est capturé par des facteurs d'entrée non spécifiques présents à la surface cellulaire, tels que le LDL-R et les GAG. Puis, le virus est dirigé vers des facteurs d'entrée spécifiques comme le récepteur scavenger SR-BI, la tétraspanine CD81 et les protéines des jonctions serrées CLDN et OCLDN. Finalement, le virus rentre dans la cellule par endocytose et fusion de l'enveloppe virale avec une membrane interne.

Adapté de (Popescu and Dubuisson, 2010).

### **a) Les facteurs d'attachement**

#### **i - Les lectines**

Les lectines DC-SIGN (*dendritic cell-specific intracellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin*) et L-SIGN (*liver/lymph node-specific intracellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin*) sont des lectines de type C. Ces lectines, ancrées dans la membrane, reconnaissent des structures particulières présentes à la surface de nombreux pathogènes mais aussi des antigènes du soi. Ainsi, ces lectines permettent la capture des antigènes étrangers. De plus, les lectines de type C peuvent servir de molécules d'adhésion et ainsi promouvoir les interactions avec les  $L_T$  ou les cellules endothéliales (Koppel *et al.*, 2005). Une interaction spécifique entre les lectines L- et DC-SIGN et la glycoprotéine d'enveloppe E2 soluble (Gardner *et al.*, 2003 ; Pöhlmann *et al.*, 2003), les HCVpp (Lozach *et al.*, 2004) ou encore les particules virales issues de sera de patients (Gardner *et al.*, 2003) a été rapportée. De même, les glycoprotéines d'enveloppe du HCV interagissent avec les lectines L- et DC-SIGN endogènes exprimées à la surface des cellules sinusoidales hépatiques en culture (Lai *et al.*, 2006) ou sur les DC (Ludwig *et al.*, 2004).

Cependant, les HCVpp sont incapables d'infecter des cellules exprimant de manière transitoire les lectines L- et DC-SIGN. De même, les cellules sinusoïdales hépatiques en culture ne sont pas permissives à l'infection par les HCVpp et les HCVcc (Lai *et al.*, 2006). Cependant, l'infectivité peut être reproduite en utilisant des cellules hépatocytaires permissives (Cormier *et al.*, 2004b ; Lozach *et al.*, 2004).

La lectine L-SIGN est principalement exprimée par les cellules sinusoïdales hépatiques ou au niveau des sinusoïdes des ganglions lymphatiques. La lectine DC-SIGN, quant à elle, est caractéristique d'une certaine catégorie de DC (Khoo *et al.*, 2008). Ces deux types cellulaires sont retrouvés à proximité des hépatocytes (voir partie II.D.1.a.i.). Ainsi, la capture du HCV par les cellules exprimant les lectines L- et DC-SIGN pourrait faciliter l'accès du virus aux hépatocytes (Cormier *et al.*, 2004b ; Lozach *et al.*, 2004 ; Lai *et al.*, 2006). Premièrement, les cellules sinusoïdales hépatiques pourraient capturer le virus circulant dans le sang à l'aide de la lectine L-SIGN puis le transférer vers l'espace de Disse et les hépatocytes. Deuxièmement, les DC présentes dans la circulation sanguine et les muqueuses pourraient capturer le virus par l'intermédiaire de DC-SIGN et s'épancher vers le sinusoïde hépatique fenestré afin d'amener le virus vers les hépatocytes. Enfin, le transfert du virus des L<sub>B</sub> vers les hépatocytes a été décrit. Ce dernier implique la présence des lectines L- et DC-SIGN (Stamataki *et al.*, 2009).

Le récepteur des asialoglycoprotéines, une autre lectine de type C fortement exprimée dans le foie, pourrait constituer un récepteur du HCV (Saunier *et al.*, 2003). Cependant, ce résultat obtenu avec les glycoprotéines exprimées par un baculovirus, n'a jamais été confirmé avec d'autres systèmes. En effet, les glycoprotéines E1 et E2 exprimées en cellules d'insectes, peuvent présenter un profil de glycosylation différent qui pourrait biaiser l'interaction entre les glycoprotéines et cette lectine.

## ii - Les glycosaminoglycanes

Les glycosaminoglycanes sont des facteurs cellulaires utilisés par de nombreux virus pour s'attacher à la surface cellulaire (pour revue (Spillmann, 2001)). Ils sont constitués de longues chaînes polysaccharidiques pouvant être liées de manière covalente à une protéine afin de former un protéoglycane. Ils sont regroupés en plusieurs catégories (Varki *et al.*, 2009).

L'héparine, un homologue des héparanes sulfates (ils correspondent à l'une des catégories de GAG), est synthétisée par les mastocytes. La forme soluble de la glycoprotéine E2, ainsi que la glycoprotéine E1, sont capables de se lier à l'héparine (Barth *et*

*al.*, 2003 ; Barth *et al.*, 2006). De plus, la préincubation du virus avec de l'héparine, mais aussi le traitement des cellules avec de l'héparinase (une enzyme capable de dégrader les héparanes sulfates présents à la surface cellulaire), inhibent la liaison des virions issus de patients à la surface cellulaire (Germi *et al.*, 2002). De même, l'infection par les HCVpp et les HCVcc (Barth *et al.*, 2006 ; Koutsoudakis *et al.*, 2006 ; Basu *et al.*, 2007 ; Morikawa *et al.*, 2007) est inhibée en présence de ces deux éléments. Cependant, aucune interaction n'a été détectée entre l'héparine et les glycoprotéines d'enveloppe des HCVpp. Toutefois, les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 intracellulaires lient efficacement l'héparine (Callens *et al.*, 2005). Les glycoprotéines d'enveloppe associées aux particules virales infectieuses du HCV, intracellulaires ou sécrétées, interagissent également avec l'héparine (Vieyres *et al.*, 2010). Enfin, les particules du HCV peuvent être purifiées, à partir du sérum de patient, en utilisant de l'héparine, et ce, malgré la présence d'anticorps associés aux virions (Zahn and Allain, 2005). Conformément à cette observation, des anticorps purifiés, issus du sérum de patient, inhibent la liaison de la glycoprotéine E2 soluble à l'héparine (Barth *et al.*, 2006).

Par conséquent, les GAG pourraient faciliter l'attachement du HCV à la surface cellulaire (Koutsoudakis *et al.*, 2006). Cependant, il semble que la composition des GAG soit importante concernant le tropisme du virus pour sa cellule hôte. En effet, la sulfatation des GAG semble être nécessaire (Germi *et al.*, 2002 ; Barth *et al.*, 2003 ; Barth *et al.*, 2006 ; Basu *et al.*, 2007) pour l'interaction entre les glycoprotéines d'enveloppe et les GAG. Enfin, les GAG semblent interagir avec la région HVR1 de la glycoprotéine E2 du HCV (Penin *et al.*, 2001 ; Olenina *et al.*, 2005 ; Barth *et al.*, 2006 ; Basu *et al.*, 2007). De plus, le HCV pourrait indirectement lier l'héparine, grâce aux apolipoprotéines qui lui sont associées, telles que l'ApoE (Saito *et al.*, 2003 ; Jiang *et al.*, 2012). Toutefois, certaines controverses subsistent quant à la capacité des GAG à lier les glycoprotéines d'enveloppe du HCV (Barth *et al.*, 2003 ; Basu *et al.*, 2007 ; Kobayashi *et al.*, 2012).

### **iii - Le récepteur des lipoprotéines de faible densité**

Le récepteur des lipoprotéines de faible densité, un facteur d'attachement du HCV (Agnello *et al.*, 1999 ; Lavillette *et al.*, 2005a), est présent à la surface des hépatocytes. Ce récepteur est impliqué dans la clairance des lipoprotéines transportant le cholestérol à partir de la circulation. Le LDL-R lie les apolipoprotéines (ApoE et ApoB) et est endocytosé via une voie dépendante de la clathrine (Goldstein *et al.*, 1985 ; Krul *et al.*, 1985). Le rôle du LDL-R dans l'entrée du HCV a été mis en évidence en utilisant différentes approches comme des anticorps anti-LDL-R neutralisants (Agnello *et al.*, 1999 ; Molina *et al.*, 2007), des ARN

interférants diminuant l'expression du LDL-R (Owen *et al.*, 2009) ou encore une modification chimique de l'expression du LDL-R (Molina *et al.*, 2007 ; Owen *et al.*, 2009).

Cependant, ce n'est pas parce que le HCV se lie au LDL-R que cette interaction aboutit à une infection productive (Andréo *et al.*, 2007 ; Albecka *et al.*, 2012). Toutefois, ce récepteur semble important pour une réplication optimale du génome viral (Albecka *et al.*, 2012).

### ***b) Les facteurs d'entrée spécifiques***

#### **i - La protéine CD81 et la molécule EWI-2 wint**

La protéine CD81 est une protéine de 26 kDa, appartenant à la superfamille des tétraspanines. Les tétraspanines sont des protéines de surface composées de quatre segments transmembranaires, d'un domaine cytoplasmique court et de deux boucles extracellulaires (une petite boucle extracellulaire (*small extracellular loop* ou SEL) et une grande boucle extracellulaire (*large extracellular loop* ou LEL)). De manière générale, la protéine CD81, qui n'est pas spécifique du foie, s'associe avec d'autres tétraspanines ainsi que d'autres partenaires, afin de former un réseau de tétraspanines pouvant être spécifique d'un type cellulaire donné (Boucheix and Rubinstein, 2001).

Cette protéine a été identifiée comme un facteur d'entrée du HCV en 1998 (Pileri *et al.*, 1998). Le rôle de cette protéine dans l'entrée virale a été confirmé en utilisant différents outils. Tout d'abord, des anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine CD81, ainsi qu'une forme soluble de la LEL de cette protéine, inhibent l'entrée des HCVpp (Bartosch *et al.*, 2003b ; Hsu *et al.*, 2003 ; Cormier *et al.*, 2004a ; Zhang *et al.*, 2004) et des HCVcc (Lindenbach *et al.*, 2005 ; Wakita *et al.*, 2005 ; Zhong *et al.*, 2005) dans les cellules hépatocytaires. De même, la diminution de l'expression de cette protéine à l'aide d'ARN interférants, inhibe l'infection des cellules par les HCVpp et les HCVcc (Zhang *et al.*, 2004 ; Akazawa *et al.*, 2007 ; Koutsoudakis *et al.*, 2007). De plus, l'expression ectopique de cette protéine dans des cellules non-permissives à l'infection (comme par exemple, les cellules HepG2), restaure la permissivité de ces dernières à l'infection par les HCVpp et les HCVcc (Cormier *et al.*, 2004a ; Zhang *et al.*, 2004 ; Lindenbach *et al.*, 2005). Enfin, *in vivo*, des anticorps anti-CD81 protègent des souris uPA-SCID de l'infection par le virus (Meuleman *et al.*, 2008). De manière générale, ce facteur semble jouer un rôle à une étape post-attachement des particules virales à la surface cellulaire (Koutsoudakis *et al.*, 2006).

De manière intéressante, il a été montré que le tropisme du HCV pour les hépatocytes

pourrait être lié à l'absence d'un inhibiteur présent à leur surface. En effet, l'expression d'un partenaire de CD81, appelé EWI-2wint (*EWI-2 without its N-terminus*), en bloquant l'interaction entre les glycoprotéines d'enveloppe du virus et de la tétraspanine CD81, module l'entrée de ce dernier dans les cellules (Rocha-Perugini *et al.*, 2008). Cette protéine EWI-2wint n'est pas exprimée par les hépatocytes. Elle résulte du clivage de l'extrémité N-terminale de la molécule EWI-2 (*glutamine-tryptophane-isoleucine-2*), une molécule interagissant avec la protéine CD81 (Charrin *et al.*, 2003 ; Montpellier *et al.*, 2011). Ainsi, il est possible que la protéase responsable du clivage soit absente dans les hépatocytes ou que EWI-2 ne soit pas accessible à cette protéase dans ces cellules.

## ii - Le récepteur SR-BI

La protéine SR-BI est une protéine de cinq cent neuf acides aminés. Cette protéine exprimée dans les tissus hépatiques et les tissus stéroïdogéniques peut s'oligomériser (Acton *et al.*, 1996 ; Rhainds and Brissette, 2004). Elle possède deux domaines transmembranaires. Elle catalyse le transfert du cholestérol estérifié à partir des HDL (*high density lipoproteins*).

Le récepteur SR-BI est capable de modifier l'environnement lipidique de la membrane plasmique (Rhainds and Brissette, 2004). Ce récepteur naturel pour les LDL, les HDL et les VLDL, peut également lier des lipoprotéines anormalement modifiées (comme les LDL oxydées, ou les LDL acétylées mais aussi les HDL oxydées) (Acton *et al.*, 1994 ; Acton *et al.*, 1996). De même, ce récepteur peut lier les apolipoprotéines comme ApoE, ApoAI, ApoAII et ApoCIII.

Le récepteur a été identifié comme facteur impliqué dans l'entrée du HCV en utilisant une forme soluble de la glycoprotéine d'enveloppe E2 (Scarselli *et al.*, 2002). Des anticorps (Bartosch *et al.*, 2003b ; Lavillette *et al.*, 2005a ; Catanese *et al.*, 2007 ; Kapadia *et al.*, 2007) ainsi que des ARN interférants (Lavillette *et al.*, 2005a) spécifiques de cette protéine, inhibent l'infectivité des HCVpp et des HCVcc. Dreux *et al.* ont montré qu'une lignée cellulaire humaine non-hépatique, ainsi qu'une lignée cellulaire non-humaine, peuvent devenir permissives à l'infection par les HCVpp et les HCVcc après la *trans*-complémentation du récepteur SR-BI humain (Dreux *et al.*, 2009). Ainsi, cette équipe a confirmé le rôle essentiel de cette molécule dans l'entrée du HCV. De plus, ce récepteur est utilisé par les différentes sous-populations du HCV pour entrer dans la cellule (Dao Thi *et al.*, 2012).

Toutefois, les mécanismes par lesquels SR-BI est impliqué dans l'entrée du HCV ne sont pas clairs. D'une part, il semblerait que la protéine SR-BI interagisse directement avec les glycoprotéines d'enveloppe du HCV (Scarselli *et al.*, 2002 ; Bartosch *et al.*, 2003a ; Barth

*et al.*, 2005 ; Lavillette *et al.*, 2007 ; Dao Thi *et al.*, 2012), et d'autre part, que la liaison entre ce récepteur et le virus se fasse *via* la partie lipoprotéique associée au virus (Maillard *et al.*, 2006). De plus, divers ligands de ce récepteur induisent des effets divergents sur l'entrée du HCV. En effet, les LDL oxydées, non natives, inhibent l'entrée des HCVpp et des HCVcc (Hahn *et al.*, 2006) sans perturber l'interaction entre le virus et ce récepteur. L'apolipoprotéine sérique amyloïde A (SAA), un autre ligand, inhibe aussi l'infection du HCV (Lavie *et al.*, 2006 ; Cai *et al.*, 2007). Au contraire, les HDL augmentent l'infektivité des HCVpp et des HCVcc (Bartosch *et al.*, 2005).

Pour conclure, le rôle du récepteur SR-BI dans l'infection du HCV est largement accepté mais n'est pas clair. Il inclut différents aspects : un rôle de médiateur de l'entrée virale et un rôle potentialisateur de l'entrée via les HDL.

### **iii - Les protéines des jonctions serrées : Claudine-1 et compagnie ... , Occludine**

Les jonctions serrées constituent une barrière sélective à la diffusion des solutés et maintiennent la polarité de l'hépatocyte (Tsukita *et al.*, 2001). Elles sont constituées de protéines transmembranaires, incluant l'OCLDN et les protéines claudine (CLDN), qui interagissent, *via* des partenaires cytosoliques tels que ZO-1 (*zona occludens-1*), avec l'intérieur de la cellule. La protéine CLDN-1, mais aussi l'OCLDN sont particulièrement abondantes dans le foie (Saitou *et al.*, 1997 ; Tsukita *et al.*, 2001).

La protéine CLDN-1 a été identifiée comme récepteur du HCV en utilisant une banque d'ADN complémentaires de cellules hépatiques humaines. Les cellules 293T, exprimant CD81, SR-BI et cette protéine deviennent permissives à l'infection par les HCVpp et les HCVcc (Evans *et al.*, 2007). De plus, les cellules 293T sont également permissives à l'infection par les HCVpp, après expression des CLDN-6 ou CLDN-9 (Meertens *et al.*, 2008). Cependant, contrairement à la CLDN-1, les CLDN-6 et CLDN-9 ne sont pas exprimées dans les lignées hépatocytaires permissives au virus. Ainsi, leur rôle exact dans l'infection reste indéterminé. Dans les lignées cellulaires permissives au HCV, la protéine CLDN-1 est présente au niveau des contacts cellule/cellule (Yang *et al.*, 2008). Toutefois, dans les hépatocytes polarisés, elle est principalement localisée au niveau des jonctions serrées. Ainsi, cette protéine pourrait intervenir après une migration latérale des complexes virus-recepteurs au niveau de ces jonctions (Brazzoli *et al.*, 2008).

L'occludine a été identifiée comme nouveau facteur d'entrée du HCV (Ploss *et al.*, 2009). Cette protéine transmembranaire des jonctions serrées est très exprimée dans le

foie (Saitou *et al.*, 1997). L'expression de cette protéine par un clone cellulaire murin (NIH3T3), en combinaison des autres facteurs d'entrée CD81, SR-BI et CLDN-1, augmente fortement la permissivité des HCVpp. De plus, l'utilisation d'ARN interférants ciblant l'OCLDN inhibe l'infection de cellules hépatocytaires permissives, par les HCVpp et les HCVcc (Liu *et al.*, 2009a). De même que pour la protéine CLDN-1, l'OCLDN pourrait intervenir, au niveau des jonctions serrées, après une migration latérale des complexes virus-récepteurs.

#### iv - Les récepteurs EGFR et EphA2

En 2011, le récepteur du facteur de croissance épidermique (*epidermal growth factor receptor* ou EGFR) et le récepteur à l'éphrine A2 (*ephrin receptor A2* ou EphA2) ont été identifiés en tant que facteurs d'entrée du HCV (Lupberger *et al.*, 2011). Ces deux récepteurs à activité tyrosine kinase, sont fortement exprimés dans le foie humain (Hidalgo and Bloedow, 2003 ; Shepherd *et al.*, 2005 ; Li *et al.*, 2010). De manière importante, l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de l'EGFR, l'erlotinib, ainsi que l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de l'EphA2, le dasatinib, inhibent de manière dose-dépendante l'entrée et l'infection du HCV, sans effet sur la réplication (Lupberger *et al.*, 2011). Enfin, il semble que l'internalisation de l'EGFR dépende de l'association entre le HCV et la protéine CD81 (Diao *et al.*, 2012).

#### v - Le récepteur d'absorption du cholestérol Niemann-Pick C1-Like 1

Le récepteur d'absorption du cholestérol *Niemann-Pick C1-Like 1* (NPC1L1) est exprimé à la surface apicale des hépatocytes des primates et des hommes (Davis *et al.*, 2004 ; Davies *et al.*, 2005). C'est une protéine à treize domaines transmembranaires et trois LEL.

*In vitro*, un rôle du récepteur NPC1L1 dans l'infection du HCV a récemment été montré (Sainz *et al.*, 2012). L'utilisation d'ARN interférants ou d'anticorps dirigés spécifiquement contre ce récepteur, empêche l'initiation de l'infection des HCVcc dans les cellules hépatocytaires. *In vitro*, l'utilisation de l'ézétimibe, un antagoniste de ce récepteur (Chang and Chang, 2008 ; Weinglass *et al.*, 2008), bloque de manière indépendante du génotype, l'absorption virale (Sainz *et al.*, 2012). De plus, *in vivo*, cet antagoniste retarde l'établissement d'une infection dans des souris humanisées. De manière intéressante, la première LEL du récepteur NPC1L1 est importante pour l'entrée du HCV dans les cellules.

### ***c) L'internalisation***

Afin d'atteindre les compartiments endosomaux, le HCV doit être internalisé. Ce processus implique l'interaction du virus avec de nombreux facteurs cellulaires et une endocytose dépendante de la clathrine.

Ainsi, l'utilisation d'inhibiteurs de l'acidification des endosomes, tels que la bafilomycine A1, la concanamycine A ou le chlorure d'ammonium, a permis de montrer que l'entrée des HCVpp (Bartosch *et al.*, 2003c ; Hsu *et al.*, 2003) et des HCVcc (Blanchard *et al.*, 2006 ; Koutsoudakis *et al.*, 2006) est dépendante du pH. Ceci suggère que le HCV entre dans ses cellules cibles par endocytose. De même, l'utilisation d'inhibiteurs chimiques ou d'ARN interférants a montré que l'entrée de ce virus a lieu via une voie d'endocytose dépendante de la clathrine (Blanchard *et al.*, 2006 ; Meertens *et al.*, 2006). De plus, l'utilisation de mutants dominants négatifs des petites guanosine triphosphatases Rab5 et Rab7 suggère que le virus fusionne avec les endosomes précoces (Meertens *et al.*, 2006).

### ***d) La fusion***

Les virus enveloppés fusionnent leur enveloppe virale avec la membrane de la cellule afin d'introduire leur génome dans la cellule. Pour le HCV, la fusion, médiée par les glycoprotéines d'enveloppe requiert également une acidification du pH au niveau des endosomes précoces.

Par homologie aux protéines de fusion de classe II, auxquelles la protéine de fusion du HCV est susceptible d'appartenir, il est probable que les hétérodimères E1 et E2 soient incorporés à la surface du virion dans un état métastable. Lors de leur activation, ces derniers adopteraient une conformation relâchée, plus stable. Ainsi, avant la fusion, les protéines de fusion se présenteraient sous forme plane à la surface du virion. Puis, suite au changement de pH au niveau des endosomes, ces hétérodimères se réorganiseraient en trimères orientés perpendiculairement à la membrane virale. Ce changement de conformation libérerait de l'énergie permettant le rapprochement des membranes cellulaire et virale, leur apposition et leur fusion. *In fine*, un pore serait formé et le génome viral importé dans la cellule cible (Harrison, 2008).

L'utilisation des HCVpp et des HCVcc a permis de montrer que le processus de fusion du HCV est dépendant du pH. Pour de nombreux virus enveloppés, un pH acide active un changement de conformation irréversible nécessaire au processus de fusion entre l'enveloppe virale et la membrane endosomale. Généralement, ces virus sont inactivés par un traitement

physique à pH acide. Cependant, un tel traitement n'a pas d'effet sur l'infectiosité des particules du HCV. De plus, pour ce virus, la fusion est dépendante de la température (Lavillette *et al.*, 2006). Ceci a été mis en évidence en utilisant des HCVpp et des liposomes. En outre, ce processus pourrait être facilité par la présence de cholestérol (Haid *et al.*, 2009). De plus, une région de la protéine E1 et deux régions de la glycoprotéine E2 participent au mécanisme de fusion du HCV (Lavillette *et al.*, 2007). Il a été montré que la mutation de certains résidus des domaines transmembranaires des glycoprotéines E1 et E2 altère la propriété de fusion de ces dernières (Ciczora *et al.*, 2007). De manière intéressante, l'arbidol est capable d'inhiber cette étape de l'entrée virale (Pêcheur *et al.*, 2007).

## 2) Traduction et synthèse des protéines virales

Puisque le génome du HCV est un brin positif d'ARN, une fois dans le cytoplasme, ce dernier est directement traduit en une polyprotéine. Ainsi, l'IRES du HCV recrute les sous-unités ribosomales, les facteurs d'initiation de la traduction et le complexe méthionyl-ARN de transfert initiateur de l'hôte (Ji *et al.*, 2004 ; Otto and Puglisi, 2004 ; pour revue Fraser and Doudna, 2007). La traduction du signal peptide de la polyprotéine dirige cette dernière vers le ER. *In fine*, la polyprotéine est clivée co- et post-traductionnellement par des protéases virales et cellulaires pour générer les dix protéines matures (voir partie II.B.4.a.).

## 3) Réplication de l'ARN génomique viral

Le virus de l'hépatite C réplique son génome au niveau de complexes de réplication regroupant des protéines non structurales virales. Cependant, le mécanisme d'amplification du génome du HCV n'est pas entièrement connu. Néanmoins, la synthèse des brins négatifs d'ARN requiert l'interaction entre deux séquences localisées dans la région X de l'extrémité 3' de l'ARN et la structure secondaire 5BSL3.2 située dans la séquence codant la protéine NS5B. Suite à cette interaction, la protéine NS5B est recrutée (Lee *et al.*, 2004 ; Friebe *et al.*, 2005). De plus, l'interaction du miR-122 avec deux sites localisés dans l'extrémité 5' favorise la réplication (Jopling *et al.*, 2005 ; Jopling, 2008). Par la suite, les brins négatifs néosynthétisés serviront de matrices pour l'amplification du pool d'ARN positifs. Ceux-ci seront alors encapsidés dans de nouvelles particules virales ou utilisés pour la synthèse des protéines virales.

Les protéines virales jouent un rôle important dans la formation des complexes de réplication. Ainsi, la protéine NS4A ancre la protéine NS3 dans la membrane du ER et

favorise son activité hélicase, requise pour la réplication de l'ARN viral (Wolk *et al.*, 2000 ; Pang *et al.*, 2002 ; Kuang *et al.*, 2004). D'autre part, la protéine NS4B induit la formation des « *membranous webs* ». En outre, la protéine NS5B assure la fonction d'ARN polymérase (Behrens *et al.*, 1996 ; Egger *et al.*, 2002). La protéine NS5A, quant à elle, lie l'ARN viral et interagit avec la protéine NS5B afin de moduler son activité enzymatique. Ainsi, l'ensemble de ces interactions permettent la modulation de l'activité de la polymérase virale et facilitent le transport de l'ARN viral entre les différents compartiments nécessaires à la traduction, à la réplication et à l'assemblage du HCV (Shimakami *et al.*, 2004 ; Appel *et al.*, 2005 ; Huang *et al.*, 2005).

Certains facteurs cellulaires jouent également un rôle dans la réplication de l'ARN viral. C'est notamment le cas des protéines VAP-A ou VAP-B (Evans *et al.*, 2004 ; Hamamoto *et al.*, 2005), des cyclophilines (Kaul *et al.*, 2009 ; Liu *et al.*, 2009b ; Chatterji *et al.*, 2010), de la PKR2 (Kim *et al.*, 2004), des protéines FKBP8 (*FK506 binding protein 8*) et Hsp90 (*heat shock protein 90*) (Okamoto *et al.*, 2006 ; Ujino *et al.*, 2009) et du facteur d'échange nucléotidique GBF-1 (*golgi-associated brefeldin A-resistant factor*) (Goueslain *et al.*, 2010) et de la protéine kinase PI4K-III $\alpha$  (*class III phosphatidylinositol 4-kinase alpha*) (Berger *et al.*, 2009 ; Borawski *et al.*, 2009 ; Bianco *et al.*, 2012).

#### 4) Assemblage et sécrétion des virions néo-synthétisés

L'étude de l'assemblage du HCV a été facilitée grâce à l'utilisation du système HCVcc (Lindenbach *et al.*, 2005 ; Wakita *et al.*, 2005 ; Zhong *et al.*, 2005). L'association de la protéine core avec les LD semble essentielle pour la production virale (Boulant *et al.*, 2006 ; Boulant *et al.*, 2007 ; Shavinskaya *et al.*, 2007). De plus, les protéines NS3 et NS5A semblent impliquées dans les étapes précoces de l'assemblage. En effet, ces protéines sont retrouvées à proximité des LD (Miyanari *et al.*, 2007). Actuellement, le modèle d'assemblage proposé pour le HCV, suggère une interaction entre la protéine core et les LD via son domaine D2 ainsi qu'un recrutement de la protéine NS5A, au niveau des sites d'assemblage (Appel *et al.*, 2008 ; Masaki *et al.*, 2008).

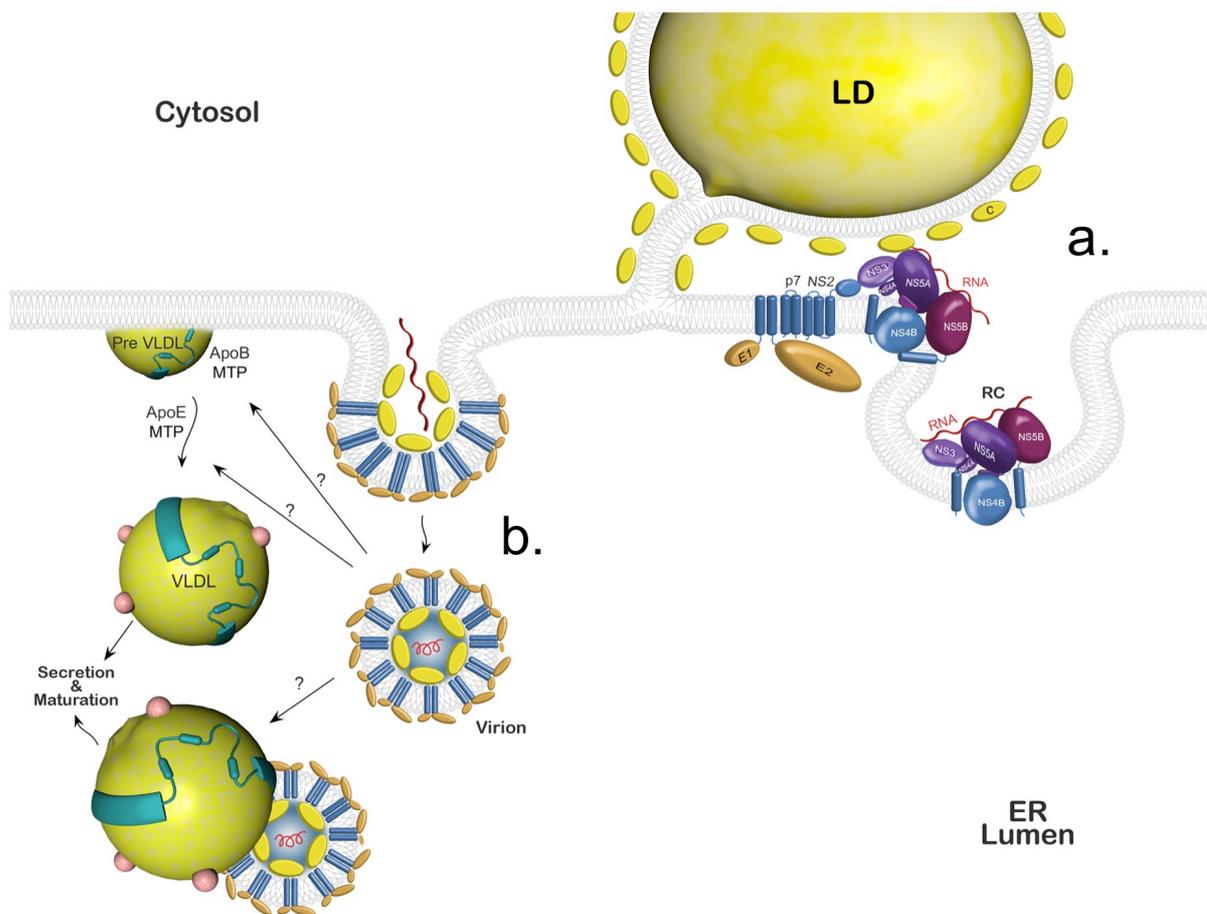
D'autre part, le mécanisme d'assemblage du HCV n'a pas encore été entièrement élucidé. Il semble que ce virus utilise la voie d'assemblage et de sécrétion des VLDL. En effet, de nombreuses protéines impliquées dans le métabolisme lipidique sont retrouvées associées aux membranes contenant la protéine NS5A. Par exemple, la diminution de la production de l'ApoB inhibe la production virale (Icard *et al.*, 2009). De même, l'inhibition

de la MTP (*microsomal triglyceride transfer protein*), une protéine impliquée dans la voie de biosynthèse des VLDL, inhibe également la production virale (Huang *et al.*, 2007). Enfin, les apolipoprotéines ApoE et ApoC1 sont également associées avec les particules du HCV (Chang *et al.*, 2007 ; Meunier *et al.*, 2008 ; Jiang and Luo, 2009 ; Benga *et al.*, 2010 ; Cun *et al.*, 2010). Le modèle d'assemblage du HCV est présenté dans la figure 17 (Tews *et al.*, 2010 ; Popescu *et al.*, 2011b).

L'utilisation de systèmes hétérologues suggère que les hétérodimères E1 et E2 non-covalents du HCV correspondent aux complexes fonctionnels impliqués dans l'entrée du HCV (Op De Beeck *et al.*, 2004). Cependant, les glycoprotéines d'enveloppe associées au virus HCVcc, forment d'importants complexes stabilisés par des ponts disulfure. Néanmoins, intracellulairement, ces protéines sont retrouvées assemblées sous forme d'hétérodimères non-covalents (Vieyres *et al.*, 2010). Ainsi, la présence des ponts disulfure entre les glycoprotéines d'enveloppe du HCV suggère des interactions latérales entre les glycoprotéines. Ces derniers pourraient jouer un rôle dans le bourgeonnement de la particule virale. De manière intéressante, les particules subvirales du HCV ne peuvent être produites dans des lignées cellulaires ne produisant pas de lipoprotéines (Icard *et al.*, 2009 ; Pécheur *et al.*, 2010). Ainsi, il semble que les glycoprotéines E1 et E2 jouent un rôle actif dans le processus du bourgeonnement viral.

### **5) La transmission du virus de cellule à cellule**

Un mode de transmission alternatif connu pour le HCV est la transmission de cellule à cellule. Ainsi, le virus est transmis d'une cellule à l'autre par l'intermédiaire des jonctions serrées (Timpe *et al.*, 2008 ; Witteveldt *et al.*, 2009). La protéine CLDN-1 semble être impliquée (Timpe *et al.*, 2008) dans ce mode de transmission. Néanmoins, les glycoprotéines d'enveloppe du HCV, nécessaires pour la transmission du virus d'une cellule à l'autre, ne sont pas accessibles aux anticorps neutralisants (Timpe *et al.*, 2008 ; Witteveldt *et al.*, 2009). Par conséquent, ce mode de transmission représente, pour le HCV, une alternative d'échappement à la neutralisation. De plus, des résultats contradictoires ont été publiés concernant l'implication de CD81 dans ce processus. Il semble toutefois admis que cette molécule ne soit pas nécessaire à la transmission de cellule à cellule.



**Figure 17. Modèle d'assemblage du HCV.**

a. L'assemblage des particules virales débute dans le cytosol où la protéine de capside (C, en jaune) s'accumule à la surface des gouttelettes lipidiques (LD). Cette protéine recrute les complexes de réplication au niveau de ces organelles via des interactions avec des protéines non structurales et notamment la protéine NS5A, afin d'encapsider l'ARN génomique viral.

b. La capside néoformée bourgeonne au niveau de la membrane du ER pour s'envelopper et acquérir les glycoprotéines d'enveloppe (en orange). La maturation de la particule virale se fait via la voie d'assemblage des VLDL.

D'après (Tews *et al.*, 2010).

## Partie III - Les flavonoïdes

### A. Généralités sur les flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent les métabolites secondaires des plantes. Par définition, ces molécules ne participent pas, de manière directe, au développement de la plante. Ces molécules naturelles, appartenant à la famille des polyphénols, comprennent plus de quatre mille cinq cents membres. De manière intéressante, les concentrations de ces métabolites varient en fonction des conditions de croissance et de maturité de la plante (Cao *et al.*, 1996 ; Cook and Samman, 1996 ; Di Carlo *et al.*, 1999). Ces derniers possèdent de nombreuses propriétés telles que des propriétés anti-inflammatoires, anti-allergiques, vasorelaxatrices, anti-tumorales, anti-microbiennes, anti-fongiques et antivirales.

#### 1) Structure de base des flavonoïdes

Les flavonoïdes possèdent un squelette de base à quinze carbones (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>) (Figure 18). Ils sont constitués de deux noyaux benzènes, A et B, et d'un noyau de type benzopyrane, C (Figure 18).

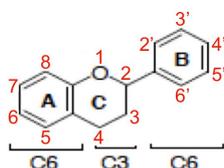


Figure 18. Structure commune des flavonoïdes.

Le cycle A peut posséder trois (dans ce cas, il est de type phloroglucinol) ou deux (dans ce cas, il est de type résorcinol) groupements hydroxyles (Figure 19).

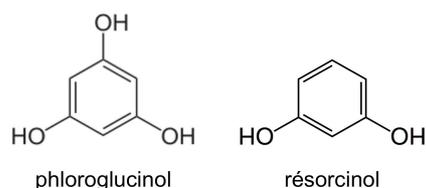
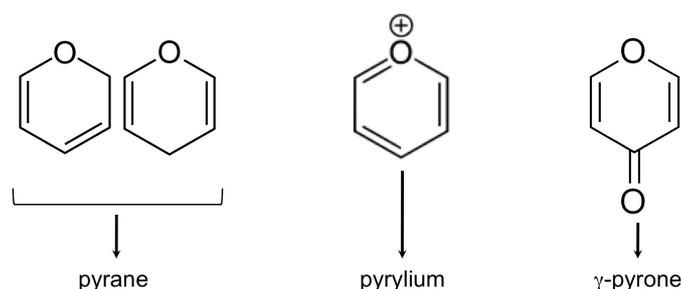


Figure 19. Structure du phloroglucinol et du résorcinol.

Le cycle B, quant à lui, peut posséder un, deux ou trois groupements hydroxyles. De plus, les groupements hydroxyles de ces deux cycles peuvent être substitués par d'autres groupements (comme par exemple des groupements méthyles (-CH<sub>3</sub>)). Enfin, le cycle C existe sous trois formes : pyrane, pyrylium ou  $\gamma$ -pyrone (Aron and Kennedy, 2008) (Figure 20). Généralement, chaque groupement hydroxyle, ainsi que certains atomes de carbone sont conjugués à un sucre pouvant être modifié (par exemple, le sucre peut être acylé).



**Figure 20. Représentation schématique des différentes structures pouvant être retrouvées pour le cycle C du squelette des flavonoïdes.**

De manière intéressante, selon la nature du cycle C, son degré d'insaturation et son degré d'oxydation, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs sous-classes (Aherne and O'Brien, 2002). Ces dernières se distinguent par une diversité fonctionnelle au niveau des positions 2, 3 et 4 du cycle C (Figure 18). Ainsi, différentes sous-classes de flavonoïdes sont définies parmi lesquelles les chalcones, les aurones, les flavanones, les dihydroflavonols, les flavones, les flavonols, les anthocyanidines, les isoflavones, les flavanols, les dihydrochalcones, les leucoanthocyanidines (encore appelées flavanediols) et les proanthocyanidines (encore appelées tannins condensés) ... (Tableau 5).

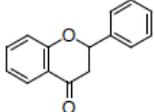
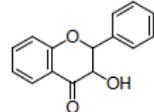
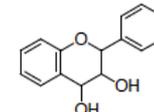
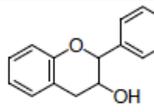
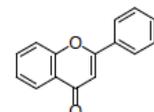
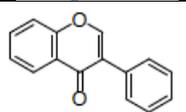
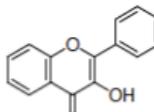
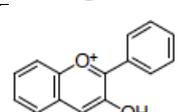
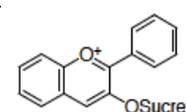
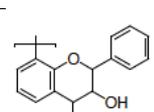
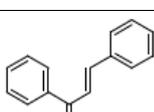
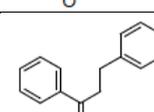
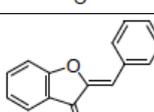
Classe	Structure de la molécule
flavanone	
dihydroflavonol	
flavan-3,4-diol ou leucoanthocyanidine	
flavan-3-ol	
flavone	
isoflavone	
flavonol	
anthocyanidine	
anthocyanine	
proanthocyanidine	
chalcone	
dihydrochalcone	
aurone	

Tableau 5. Les principales classes de flavonoïdes.

## 2) Distribution et localisation des flavonoïdes

### a) Distribution

Les flavonoïdes sont retrouvés chez les végétaux supérieurs (les Gymnospermes et les Angiospermes) ainsi que chez les végétaux inférieurs (les Bryophytes et les Ptéridophytes). Ces métabolites secondaires présentent un nombre de structures limitées au sein des Ptéridophytes et des Gymnospermes. Cependant, une grande diversité structurale existe au sein des Angiospermes. Ainsi, les flavonoïdes sont distribués de manière hétérogène au sein du règne végétal.

Les flavonoïdes sont également retrouvés au sein du règne animal. Dans ce cas, ils proviennent de l'alimentation de l'animal (Luckner, 1972). Par exemple, les flavonoïdes ingérés par les papillons donnent la pigmentation aux ailes de ces lépidoptères. De plus, la propolis, une résine végétale fabriquée par les abeilles à partir des sécrétions de bourgeons de différents arbres, possède des propriétés anti-fongiques et anti-microbiennes associées aux flavonoïdes issus de ces sécrétions (Clément *et al.*, 2011).

### b) Localisation

Majoritairement présents dans tous les organes végétaux aériens, ces métabolites secondaires sont retrouvés en forte concentration dans le parenchyme des jeunes organes tels que les feuilles et les boutons floraux (Rakipov, 1987). Toutefois, ils peuvent également être retrouvés au niveau des racines et des autres organes.

Les flavones, les flavonols, les flavan-3-ols, les isoflavones, les flavanones et les anthocyanidines sont les sous-classes flavonoïdiques les plus étudiées. En effet, ces composés naturellement présents dans la plupart des fruits et des légumes consommés par l'homme (Surh, 2003), présentent des effets bénéfiques pour la santé.

## 3) Biosynthèse et régulation

### a) Biosynthèse

Les flavonoïdes, synthétisés au niveau des plastides cytoplasmiques de la plante et s'accumulant ensuite dans le suc vacuolaire, dérivent de la voie du shikimate et de la voie de l'acétate-malonate.

#### i - La voie du shikimate

La voie du shikimate aboutit à la production de trois acides aminés aromatiques : la phénylalanine, la tyrosine et le tryptophane. Après sept étapes métaboliques, le

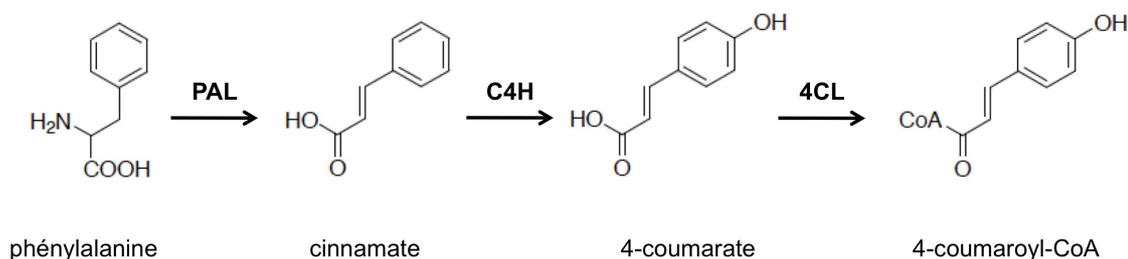
phosphoénolpyruvate et l'érythrose-4-phosphate (respectivement générés par la voie de la glycolyse et la voie des pentoses phosphates) sont convertis en chorismate, le précurseur des acides aminés aromatiques ainsi que de nombreux autres métabolites de la plante (Herrmann and Weaver, 1999).

### ii - La voie de l'acétate-malonate

La voie de l'acétate-malonate génère le malonyl-CoA (le premier précurseur de la voie de biosynthèse des flavonoïdes), par l'intermédiaire d'une réaction entre l'acétyl-CoA et le dioxyde de carbone, catalysée par l'acétyl-CoA carboxylase.

### iii - Vers la biosynthèse des flavonoïdes ...

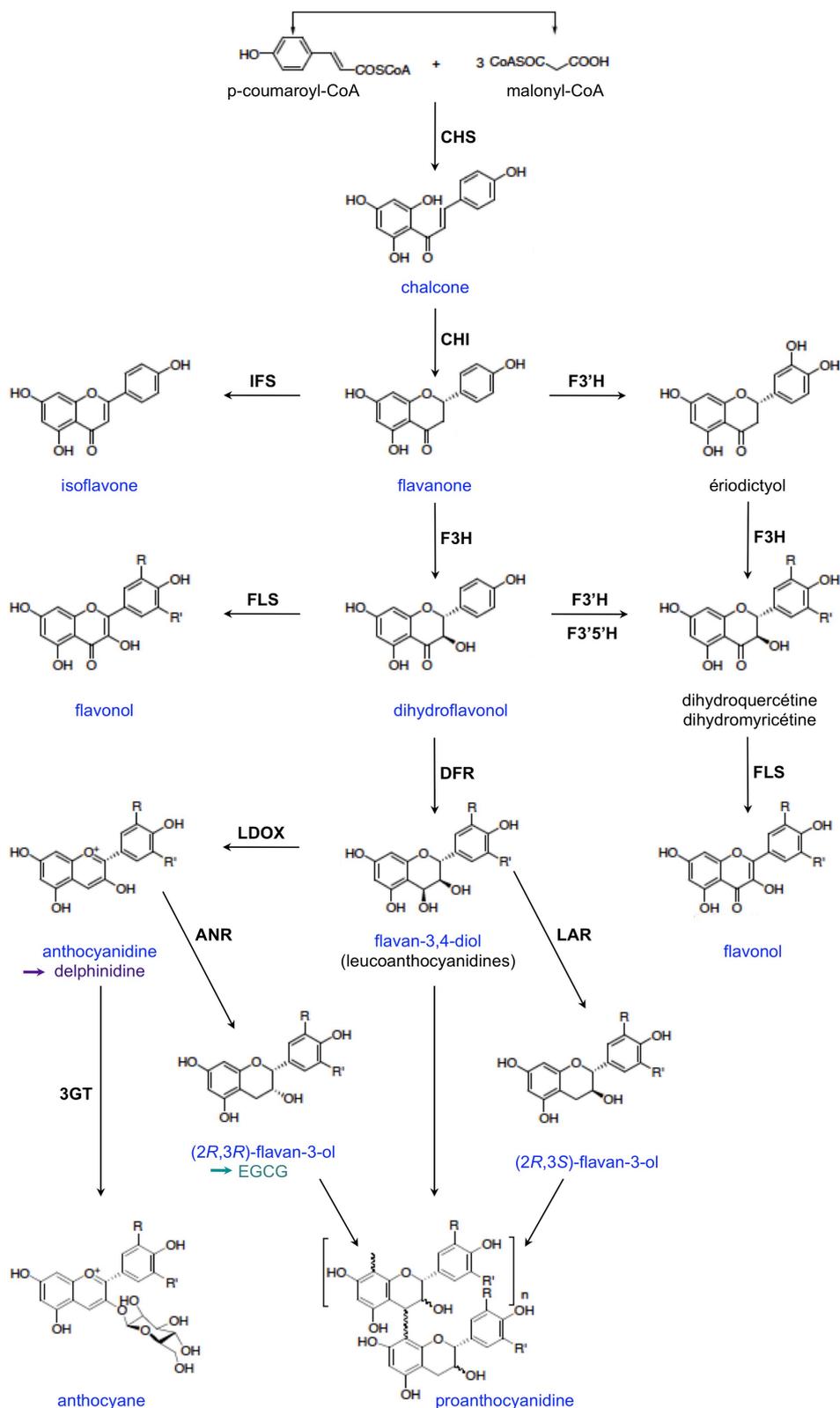
Après trois conversions enzymatiques catalysées par la phénylalanine ammonia-lyase (PAL), la cinnamate 4-hydroxylase (C4H) et la 4-coumarate : CoA ligase (4CL), la phénylalanine (issue de la voie du shikimate) est convertie en 4-coumaroyl-CoA, le deuxième précurseur des flavonoïdes (Figure 21).



**Figure 21. Formation du 4-coumaroyl-CoA, le précurseur des flavonoïdes.**

*PAL*, phénylalanine ammonia-lyase ; *C4H*, cinnamate 4-hydroxylase ; *4CL*, 4-coumarate : CoA ligase.

La voie de biosynthèse des flavonoïdes est présentée dans la figure 22. Les premiers flavonoïdes de cette biosynthèse, les chalcones, sont formés à partir du 4-coumaroyl-CoA et à partir du malonyl-CoA.



**Figure 22. Schéma général de la voie de biosynthèse des flavanoïdes.**

Lors de la première étape de biosynthèse des flavonoïdes, le 4-coumaroyl-CoA est condensé avec trois molécules de malonyl-CoA pour donner une chalcone. Ce processus est catalysé par la chalcone synthase (*CHS*). Lors de la deuxième étape, la chalcone est isomérisée pour former la flavanone. Cette

réaction peut se produire de manière spontanée ou sous l'action de l'enzyme chalcone isomérase (*CHI*). Par la suite, cette flavanone peut subir trois conversions différentes. Tout d'abord, elle peut être convertie en isoflavone sous l'action de l'isoflavone synthase (*IFS*). Ensuite, elle peut subir une hydroxylation pour former l'ériodictyol grâce à l'action de la flavonoïde 3'-hydroxylase (*F3'H*). Ce composé va ensuite être modifié successivement par deux enzymes : la flavanone 3-hydroxylase (*F3H*) et la flavonol synthase (*FLS*) pour aboutir à la formation des flavonols. Enfin, la flavanone peut aussi être oxygénée en dihydroflavonols par la flavanone 3-hydroxylase (*F3H*). Par la suite, les dihydroflavonols peuvent être hydrolysés par deux enzymes : la flavonoïde 3',5'-hydroxylase (*F3'5'H*) et la flavonoïde 3'-hydroxylase (*F3'H*). De plus, sous l'action de la *FLS*, les dihydroflavonols sont déshydrogénés en flavonols. Toutefois, la *FLS* est en compétition avec la dihydroflavonol réductase (*DFR*) qui réduit les dihydroflavonols pour former les flavan-3,4-diols (encore appelés leucoanthocyanidines). Ensuite, la leucoanthocyanidine dioxygénase (*LDOX*) encore appelée anthocyanidine synthase (*ANS*) oxyde les leucoanthocyanidines en anthocyanidines. Sous l'action de l'anthocyanidine réductase (*ANR*), les anthocyanidines sont ensuite transformées en flavan-3-ols ou sont stabilisées en anthocyanes par glycosylation, sous l'action de la 3-glucosyltransférase (*3GT*). Les leucoanthocyanidines peuvent également être converties en flavan-3-ols sous l'action de la leucoanthocyanidine réductase (*LAR*). Pour finir, les monomères de flavan-3-ols et/ou de flavan-3,4-diols sont condensés pour donner les proanthocyanidines.

Les deux molécules auxquelles nous nous sommes intéressés au cours de cette thèse (l'épigallocatechine-3-gallate (EGCG) et la delphinidine) sont indiquées en-dessous du nom des sous-classes auxquelles elles appartiennent.

### ***b) Régulation***

La biosynthèse des flavonoïdes est induite par divers facteurs biotiques (comme par exemple, l'attaque d'un agent pathogène, la présence d'une blessure, la vie en symbiose) mais aussi par des facteurs abiotiques (tels qu'une forte luminosité, des rayonnements ultra-violets, de faibles températures, ou des carences en minéraux et en nutriments).

Différentes protéines sont impliquées dans la régulation de l'expression des gènes codant pour les enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse des flavonoïdes.

## **4) Fonction des flavonoïdes**

Les flavonoïdes possèdent divers rôles pour la plante. Les couleurs attrayantes associées à ces molécules attirent les insectes pollinisateurs, permettant la reproduction des végétaux. De plus, en favorisant la production d'un pollen pouvant germer ou ne se rompant pas lors de la formation du tube pollinique, ces molécules possèdent un rôle dans la fertilité de certains végétaux (Shirley, 1996).

De plus, de nombreux flavonoïdes agissent comme des signaux d'induction de la transcription de gènes bactériens dans le cas des plantes vivant en symbiose ou de manière commensale avec des microorganismes. Ainsi, les flavonoïdes jouent un rôle dans la croissance et le maintien des plantes. Toutefois, les flavonoïdes peuvent aussi constituer des attractants pour des microorganismes pathogènes et induire l'expression de leurs gènes de

virulence. Les flavonoïdes servent également de molécules de signalisation, dans les interactions symbiotiques avec les champignons. Cependant, les flavonoïdes jouent également un rôle dans la résistance fongique. Ainsi, après la récolte des fruits et des légumes, de fortes concentrations sont observées. Enfin, en tant que substances anti-appétantes ou réductrices de la digestion ou en tant que toxines, les flavonoïdes protègent la plante des herbivores.

## **5) Propriétés physico-chimiques des flavonoïdes**

### ***a) Solubilité***

De manière globale, la solubilité des flavonoïdes dépend de la nature et du nombre de substituants composant ces molécules. Ainsi, plus le nombre de groupements hydroxyles et le nombre d'oses est élevé, plus les flavonoïdes sont solubles dans les solvants polaires et réciproquement. De manière intéressante, les flavonoïdes sont présents sous deux formes : une forme non sucrée appelée forme aglycone (ou génine) et une forme sucrée appelée forme glycoside. Le plus souvent, chez une plante, les flavonoïdes sont présents sous une forme sucrée appelée forme glycoside. Ainsi, les flavonoïdes sous forme aglycone, hydrophobes, traversent les membranes biologiques par diffusion passive, contrairement aux flavonoïdes sous forme glycoside. Cependant, chez l'homme, certaines études montrent que l'absorption intestinale de ces derniers sous forme glycoside peut être plus importante que sous forme aglycone.

### ***b) Couleurs et propriétés spectrales***

Les flavonoïdes couvrent une large palette de couleurs. Ainsi, les flavonoïdes les plus réduits sont incolores. Cependant, les chalcones, les aurones et les flavonols sont caractérisés par une coloration jaune. Enfin, les anthocyanidines se distinguent par un éventail de couleurs allant du rose-rouge au violet foncé. Pour ces dernières, l'intensité de la coloration bleu-violet augmente avec le nombre de substitutions. Au contraire, la méthylation des groupes hydroxyles, chatoient ces dernières en rouge. De manière importante, la combinaison entre plusieurs types de flavonoïdes peut entraîner des changements de couleurs. Ainsi, du fait de cette diversité de couleur, les flavonoïdes présentent des propriétés spectrales d'absorption dans les ultraviolets proches du visible permettant de les distinguer.

## **6) Propriétés biologiques des flavonoïdes**

Constituant des molécules de défense contre les organismes pathogènes, il n'est pas surprenant de constater que certains flavonoïdes possèdent des potentiels thérapeutiques

contre les bactéries, les virus, les champignons, les parasites et les insectes. Néanmoins, certaines de leurs propriétés thérapeutiques peuvent être expliquées par leurs fortes capacités antioxydantes.

De plus, ces métabolites secondaires exercent de nombreuses activités biologiques (comme, par exemple, une activité phytoestrogénique (associée aux isoflavonoïdes), une activité vasculo-protectrice, anti-hépatotoxique, anti-allergique, anti-inflammatoire, anti-ulcéreuse, antispasmodique, anti-diarrhéique et même anti-tumorale) en modulant l'activité de certaines enzymes et en modifiant le comportement de plusieurs systèmes cellulaires.

D'autre part, en tant que piègeurs des radicaux libres, les flavonoïdes sont également impliqués dans la prévention des dommages oxydatifs causés par les dérivés réactifs de l'oxygène (*reactive oxygen species* ou ROS) (Merken and Beecher, 2000). Ainsi, *in vitro*, certains flavonoïdes présentent une activité contre les processus inflammatoires et, de ce fait, contre les maladies inflammatoires chroniques et l'arthrose.

Toutefois, chez l'homme, le métabolisme et la biodisponibilité des flavonoïdes sont à prendre en considération afin d'établir leur potentiel thérapeutique réel (Hollman and Katan, 1997 ; Bruneton, 1999).

## **B. L'épigallocatechine-3-gallate**

L'épigallocatechine-3-gallate ou EGCG, une catéchine appartenant à la famille des flavonoïdes, est majoritairement présente dans l'extrait de thé vert.

### **1) Généralités sur le thé**

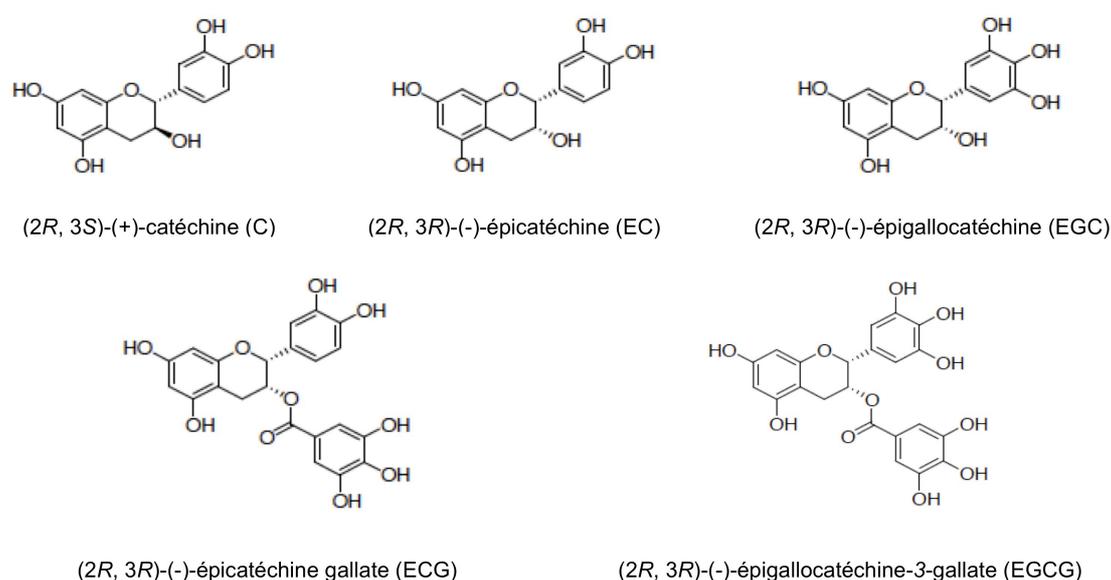
Le thé, après l'eau, est l'une des boissons les plus consommées dans le monde. Différents types de thé existent : noir, oolong et vert. Ces derniers sont produits à partir des feuilles issues de l'arbre à thé (encore appelé théier) : *Camellia sinensis*.

Le thé vert est produit en chauffant des feuilles fraîches, à la vapeur et à de hautes températures. Grâce à ce procédé, les enzymes d'oxydation sont inactivées et le contenu polyphénolique des feuilles n'est pas altéré (Astill *et al.*, 2001).

### **2) Les flavan-3-ols : les principes flavonoïdiques actifs du thé vert**

Les flavonoïdes contenus dans le thé vert sont souvent des flavan-3-ols monomériques (Astill *et al.*, 2001 ; Yao *et al.*, 2005) (encore appelés catéchines), dont le plus abondant est

l'EGCG. Il s'ensuit ensuite l'épigallocatechine (EGC), l'épicatéchine gallate (ECG), l'épicatéchine (EC) et la catéchine (C) (McKay and Blumberg, 2002) (Figure 23). Ces molécules sont caractérisées par la présence d'une seule substitution en position 3 (un groupement hydroxyle, OH), sur le cycle C. De plus, plusieurs stéréoisomères existent du fait de la présence de deux carbones asymétriques, en positions 2 et 3 de ce même cycle (voir partie III.A.3.a.iii.). Ainsi, les catéchines du thé possèdent une configuration – *cis* (encore appelée configuration 2*R*, 3*R*) au niveau de ces positions.



**Figure 23. Représentation schématique des différentes catéchines (flavan-3-ols) présentes dans le thé vert.**

### 3) Effets associés à l'EGCG

#### a) Effets généraux de l'EGCG

Les flavan-3-ols sont de puissants antioxydants. L'EGCG possède de nombreuses propriétés : antioxydante, anti-cancéreuse, anti-inflammatoire, anti-microbienne, thermogénique et probiotique. Cette molécule se lie sur de nombreuses molécules biologiques et module différentes enzymes et voies de signalisation (Lee *et al.*, 2002 ; Tachibana *et al.*, 2004 ; Chen *et al.*, 2011 ; Tachibana, 2011). De manière intéressante, il semble que l'EGCG inhibe la voie de sécrétion des VLDL (Li *et al.*, 2006).

### ***b) Effets antiviraux associés à l'EGCG***

Plusieurs publications relatent les effets antiviraux associés à l'EGCG. Il semble que cette molécule soit active, aussi bien sur les virus enveloppés que les virus non enveloppés.

#### **i - Les virus enveloppés**

Tout d'abord, l'EGCG possède un effet antiviral contre le HIV-1. Différents mécanismes ont été proposés pour expliquer ce dernier. Nakane *et al.* ont montré, *in vitro*, une inhibition de la réplication du HIV-1 dans les cellules mononuclées du sang périphérique (Nakane and Ono, 1989). Dans cette étude, l'EGCG a été décrite comme une molécule inhibitrice de l'activité enzymatique de la transcriptase inverse de ce virus. Ce mode d'action a été confirmé par d'autres équipes (Yamaguchi *et al.*, 2002 ; Li *et al.*, 2011). D'autre part, l'EGCG, en se liant à la surface de l'enveloppe virale et en déstructurant la membrane phospholipidique, peut induire la lyse des particules virales (Fassina *et al.*, 2002 ; Yamaguchi *et al.*, 2002). De plus, cette molécule, en liant le récepteur CD4, peut empêcher l'attachement du HIV-1, à la surface cellulaire. En effet, dans ce cas, l'EGCG bloque l'interaction entre la glycoprotéine d'enveloppe gp120 du virus et le récepteur cellulaire CD4, présent à la surface des cellules T (Kawai *et al.*, 2003).

L'activité antivirale de l'EGCG contre les virus HSV-1 et HSV-2 s'expliquerait par un effet direct de la molécule sur le virion (Isaacs *et al.*, 2008 ; Isaacs *et al.*, 2011). Il semblerait que la molécule déstructure les glycoprotéines d'enveloppe virales. De manière intéressante, des dimères de cette molécule sont plus efficaces contre ces virus (Isaacs *et al.*, 2011).

Par la suite, des effets antiviraux dus à l'EGCG ont également été décrits pour le virus de la grippe. Ce flavonoïde semble affecter la réplication de ce virus en agissant sur les facteurs cellulaires nécessaires à cette étape (Kesic *et al.*, 2011 ; Cho *et al.*, 2012 ; Ling *et al.*, 2012). De plus, cette molécule semble également agréger les particules virales entre elles (Nakayama *et al.*, 1993), empêchant ainsi l'étape d'entrée virale.

L'effet de l'EGCG sur le HBV a été étudié dans une lignée stable exprimant les antigènes de ce virus (la lignée HepG2-N10) (Xu *et al.*, 2008). Pour ce virus, l'EGCG induit une diminution des niveaux d'ADN extracellulaires, des intermédiaires de réplication et de l'ADN circulaire clos de façon covalente (ADNccc), ainsi que de l'expression des antigènes du HBV. Une étude récente a confirmé la diminution des intermédiaires de réplication par l'EGCG, résultant d'une diminution de la production d'ADNccc (He *et al.*, 2011).

## **ii - Les virus non enveloppés**

Les publications rapportant des effets de l'EGCG sur les virus non enveloppés sont plus restreintes que celles décrivant des effets sur les virus enveloppés. Toutefois, cette molécule semble également être active contre ces virus.

L'EGCG inhibe la réplication de l'entérovirus 71 ainsi que la formation des virions néo-synthétisés (Ho *et al.*, 2009).

De plus, l'EGCG est active contre l'adénovirus de sérotype 14. Pour ce virus, l'EGCG semble agir à une étape tardive de l'infection (Weber *et al.*, 2003).

## **c) Pharmacologie**

### **i - Biodisponibilité**

L'épigallocatechine-3-gallate n'est pas une molécule très biodisponible. En effet, il semblerait que le temps de demi-vie de cette molécule soit compris entre deux et cinq heures (Yang *et al.*, 1998 ; Ullmann *et al.*, 2003). De plus, il semblerait que la biodisponibilité de cette molécule dépende de nombreux paramètres, incluant la libération digestive de cette molécule, son absorption, son métabolisme et son élimination. De plus, le niveau d'EGCG n'est pas détectable dans les urines (Yang *et al.*, 1998). Ainsi, la majorité de cette molécule semble être excrétée dans la bile. Par conséquent, afin de comprendre les effets de la consommation des polyphénols sur la santé, il est essentiel de connaître leur devenir dans l'organisme une fois ingérés afin de déterminer s'ils atteignent ou non les tissus cibles présumés.

### **ii - Absorption intestinale et métabolisme**

Après ingestion, une fraction importante des catéchines, présentes dans le thé, subissent un métabolisme enzymatique avant et après absorption dans le petit intestin, au niveau du foie (Lambert *et al.*, 2007), ainsi que dans le gros intestin et les reins (Coughtrie and Johnston, 2001). Les métabolites formés parviennent aux tissus via la circulation systémique avant d'être excrétés par les urines. L'épigallocatechine-3-gallate ne semble pas être absorbée par le petit intestin mais semble parvenir directement au gros intestin. Ainsi, la flore microbienne résidente de ce dernier va détruire le squelette flavonoïdique et générer divers métabolites de plus faible poids moléculaire.

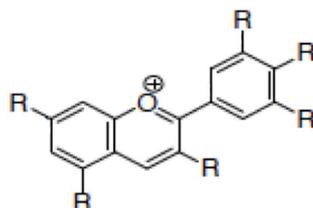
#### ***d) Facteurs influençant la biodisponibilité de l'EGCG***

Les niveaux de flavan-3-ols diminuent avec la température. Cependant, ce facteur ne semble pas avoir d'effet concernant la stabilité de l'EGCG (Wang *et al.*, 2008). Néanmoins, l'EGCG peut former des complexes avec l'albumine (Minoda *et al.*, 2010). Une telle complexation pourrait limiter l'activité de cette molécule et pourrait expliquer en partie la faible biodisponibilité de l'EGCG (Manach *et al.*, 2005 ; Van Amelsvoort *et al.*, 2001). De plus, la consommation répétée d'EGCG augmente sa concentration plasmatique (Chow *et al.*, 2003).

### **C. La delphinidine**

#### **1) Généralités sur les anthocyanidines**

La delphinidine est un flavonoïde appartenant à la sous-classe des anthocyanidines. Ces dernières constituent des pigments naturels dont la structure dérive de celle de l'ion flavylium (encore appelé l'ion 2-phényl-1-benzopyrilium) (Figure 24). Généralement, le contre-anion de l'ion flavylium est l'ion chlorure (Cl<sup>-</sup>). De manière remarquable, ces pigments possèdent une charge positive et deux doubles liaisons au niveau du cycle C qui les différencient des flavanols (Figure 25). Dans la nature, ces molécules ne se trouvent pas sous forme d'aglycones libres (correspondant aux anthocyanines), à l'exception de la cyanidine (un pigment rouge-cramoisi), la delphinidine (un pigment pourpre-violet), la malvidine (un pigment violet), la pélagonidine (un pigment rouge-orangé), la péonidine (un pigment rose-rouge) et la pétunidine (un pigment violet).



**Figure 24. Représentation de la structure de l'ion flavylium.**

Les anthocyanines possèdent de nombreuses propriétés incluant des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, anti-microbiennes, anti-cancéreuses, neuroprotectrices ...



**Figure 25. Comparaison de la structure d'une anthocyanidine (la delphinidine) et d'un flavan-3-ol (l'EGCG).**

Les anthocyanidines possèdent une charge positive et deux doubles liaisons au niveau du cycle C qui les différencient des flavanols. Les différences apparaissent en rouge.

## 2) La delphinidine : une molécule retrouvée dans de nombreux aliments

Les anthocyanidines, de puissants antioxydants, constituent les pigments responsables de la coloration de nombreuses fleurs et de nombreux fruits. Ainsi, la delphinidine et ses dérivés donnent les teintes bleues, violettes et rouges des fleurs (telles que les violettes ou les delphiniums), mais aussi des fruits (tels que les raisins du cépage Cabernet-Sauvignon, les fruits rouges, les canneberges et les grenades).

## 3) Pharmacologie

### a) Biodisponibilité de la delphinidine

La consommation d'anthocyanines, la forme sucrée des anthocyanidines, présente des effets bénéfiques pour la santé. Cependant, ces dernières sont retrouvées en faibles concentrations dans le plasma (de l'ordre du nM au  $\mu\text{M}$ ) et les urines (0,004% à 0,1% de la dose initiale est excrétée) (Manach *et al.*, 2005). Ainsi, un pic plasmatique apparaît une à trois heures après ingestion, puis ces molécules disparaissent rapidement de la circulation (en quelques heures). Cependant, les anthocyanines peuvent persister jusqu'à vingt-quatre heures dans les urines (Kay *et al.*, 2004 ; Kay *et al.*, 2005). Par conséquent, les données suggèrent, qu'après ingestion, les anthocyanines subissent diverses transformations affectant leurs bioactivités. Ainsi, la fonction physiologique des anthocyanines dépend de leur biodisponibilité sous forme native.

Actuellement, aucune donnée concernant la biodisponibilité du chlorure de delphinidine, chez la souris ou chez l'homme, n'est disponible. Cependant, nous pouvons supposer que, cette molécule, étant dépourvue de groupements osidiques, contrairement aux anthocyanines, soit plus biodisponible que ces dernières.

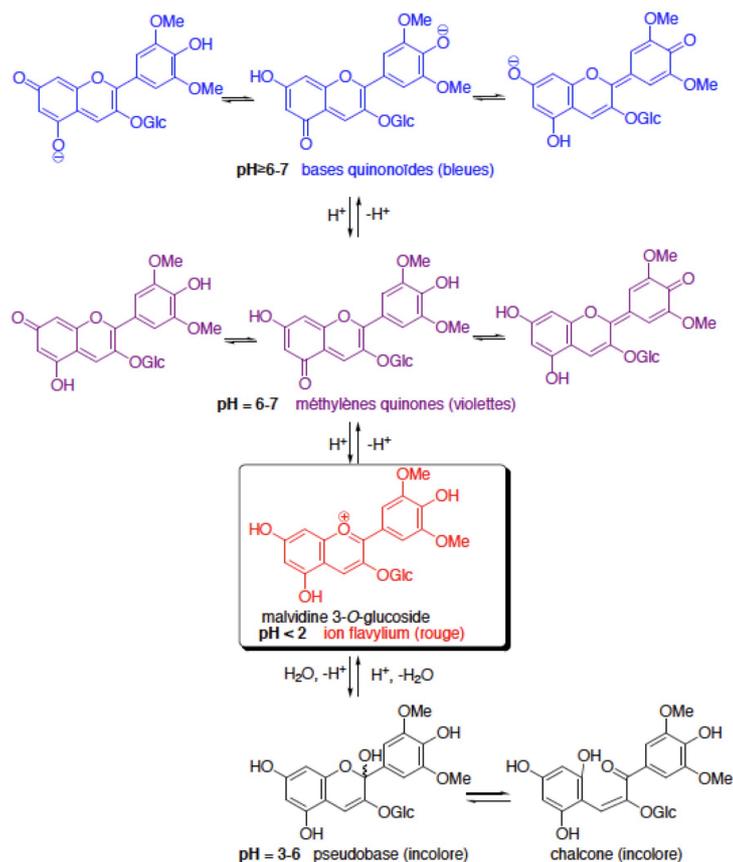
***b) Absorption et métabolisme***

De manière générale, les activités des anthocyanines dépendent de leur absorption et de leur métabolisation. Ainsi, l'absorption des anthocyanines semble avoir lieu au niveau de l'estomac et du petit intestin, par différents mécanismes impliquant des enzymes spécifiques (Passamonti *et al.*, 2003 ; Talavéra *et al.*, 2003). De manière intéressante, chez le rat, ces molécules sont également retrouvées dans d'autres organes tels que le foie, les reins et le cerveau (Talavéra *et al.*, 2005).

Aucune donnée concernant l'absorption et le métabolisme du chlorure de delphinidine n'est disponible.

***c) Différents facteurs pouvant influencer la stabilité et la biodisponibilité de la delphinidine***

Les anthocyanidines sont instables à la lumière, à la température et à l'oxygène. De plus, en milieux aqueux, quatre formes en équilibre coexistent (Figure 26) en fonction du pH. Ainsi, une perte de coloration des anthocyanines en milieu neutre ou peu acide est observée.



**Figure 26. Les différentes formes en équilibre des anthocyanines en fonction du pH.** Ici, la malvidine 3-*O*-glucoside, une anthocyanine, illustre cet équilibre.

#### D. Le virus de l'hépatite C et les composés naturels : une nouvelle stratégie antivirale ? (Hepatitis C Virus and natural compounds: a new antiviral approach?) - revue

Actuellement, dans le cadre de l'infection par le HCV, des molécules d'origine naturelle font l'objet d'études cliniques avancées. C'est notamment le cas de la silibinine, un composé flavonoïdique extrait du chardon-Marie. Dans cette revue, diverses molécules polyphénoliques possédant une activité antivirale contre le HCV ont été répertoriées et classées selon leur pertinence et leur famille chimique. L'utilisation de ces dernières comme traitement contre le HCV est discuté.

Référence bibliographique :

**Calland N., Dubuisson J., Rouillé Y., Séron K (2012).** Hepatitis C virus and natural compounds: a new antiviral approach?. *Viruses*. **4**(10): 2197-217.



# *OBJECTIFS*



Récemment, de nouveaux agents antiviraux ciblant directement le virus de l'hépatite C ont été ajoutés à la bithérapie standard composée d'interféron-alpha pégylé et de ribavirine. Ces nouveaux inhibiteurs permettent d'augmenter de manière significative la réponse virologique soutenue. Toutefois, l'efficacité de cette nouvelle trithérapie se cantonne au génotype 1 du HCV. Ainsi, afin d'établir une thérapie antivirale efficace évitant l'apparition et la sélection de mutants de résistance aux antiviraux, l'utilisation en combinaison de plusieurs agents antiviraux possédant une activité pan-génotypique et ciblant directement le virus est préconisée. C'est pourquoi la découverte de nouvelles molécules ciblant diverses étapes du cycle viral infectieux du HCV est indispensable.

Ainsi, dans, un premier temps, mes travaux de thèse ont consisté à étudier le mode d'action d'une molécule naturelle, l'EGCG, sur l'infection par le HCV. De prime abord, étant donné l'implication de cette molécule en tant qu'inhibiteur de la voie de sécrétion des VLDL et du fait de l'importance du rôle du métabolisme lipidique dans l'entrée et l'assemblage du HCV, nous avons supposé que cette molécule pourrait interférer avec l'assemblage de ce virus. Contre toute attente, notre étude montre que l'EGCG, en agissant directement sur le virus, inhibe une étape très précoce de l'entrée, sans affecter ni l'étape de réplication, ni l'étape d'assemblage/sécrétion. De plus, cette molécule, qui est active contre tous les génotypes du HCV, bloque le passage du virus de cellule à cellule aussi bien *via* la voie de sécrétion dans le milieu extracellulaire, que *via* la transmission de cellule à cellule impliquant les jonctions cellulaires. Par conséquent, en affectant les deux modes de transmission du HCV et en possédant une activité pan-génotypique, l'EGCG constitue un agent antiviral à fort potentiel thérapeutique.

Les résultats de ces travaux font l'objet de la publication suivante :

**Calland N., Albecka A., Belouzard S., Wychowski C., Duverlie G., Descamps V., Hober D., Dubuisson J., Rouillé Y., Séron K (2012).** (-)-Epigallocatechin-3-gallate is a new inhibitor of hepatitis C virus entry. *Hepatology*. **55**(3): 720-9.

Par la suite, afin d'identifier de nouvelles molécules présentant un mode d'action similaire à celui de l'EGCG et possédant une activité antivirale exacerbée, nous avons sélectionné différentes molécules naturelles et les avons testées pour leur potentiel effet anti-HCV. C'est ainsi que le chlorure de delphinidine, une anthocyanidine, a été identifié en tant que nouvelle molécule inhibitrice d'une étape précoce de l'entrée du HCV. Cette molécule, comme l'EGCG, interfère avec la liaison du virus à la surface cellulaire.

Les résultats de ces travaux font l'objet d'une publication en cours de rédaction :

**Calland N., Belouzard S., Wychowski C., Duverlie G., Descamps V., Dubuisson J., Rouillé Y., Séron K.** The anthocyanidin delphinidin is a new inhibitor of hepatitis C virus entry.

# *RÉSULTATS*



# *Partie I*

*L'épigallocatechine-3-gallate, un nouvel inhibiteur de l'entrée  
du virus de l'hépatite C*



Référence bibliographique :

**Calland N., Albecka A., Belouzard S., Wychowski C., Duverlie G., Descamps V., Hober D., Dubuisson J., Rouillé Y., Séron K (2012).** (-)-Epigallocatechin-3-gallate is a new inhibitor of hepatitis C virus entry. *Hepatology*. **55**(3): 720-9.



## *Partie II*

*La delphinidine, une molécule possédant un mode d'action comparable à celui de l'épigallocatechine-3-gallate*



**THE ANTHOCYANIDIN DELPHINIDIN IS A NEW INHIBITOR OF HEPATITIS C VIRUS ENTRY**

Noémie Calland<sup>1</sup>, Sandrine Belouzard<sup>1</sup>, Czeslaw Wychowski<sup>1</sup>, Gilles Duverlie<sup>2</sup>, Véronique Descamps<sup>2</sup>, Jean Dubuisson<sup>1</sup>, Yves Rouillé<sup>1</sup>, and Karin Séron<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut Pasteur de Lille, Center for Infection & Immunity of Lille (CIIL), F-59019 Lille, France; Inserm U1019, F-59019 Lille, France; CNRS UMR8204, F-59021 Lille, France; Université Lille Nord de France, F-59000 Lille, France.

<sup>2</sup>Laboratoire de Virologie EA4294, Centre Hospitalier Universitaire d'Amiens, Université de Picardie Jules Verne, Amiens, France.

**ABSTRACT**

**Objective.** Hepatitis C is a major health burden. It is caused by hepatitis C virus (HCV). Despite the validation of direct-acting antivirals (DAAs) for hepatitis C virus treatment directed against the viral protease, discovery of new DAAs targeting different steps of the virus life cycle is still needed. In this context, we recently identified a natural polyphenol molecule, epigallocatechin-3-gallate (EGCG) as a new inhibitor of HCV entry exhibiting an half maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) in cell culture of approximately 11 μM. Our goal was to identify new molecules, starting from EGCG scaffold, with enhanced anti-HCV activity.

**Design.** We thus selected a series of natural compounds according to their structure similarity to EGCG, and tested their anti-HCV activity.

**Results.** This approach led us to identify delphinidin as a new inhibitor of HCV entry. This molecule is a polyphenol belonging to the anthocyanidin subclass of flavonoids, a pigment which gives the red-blue color to flowers and berries. We first demonstrated that delphinidin chloride, like EGCG, is able to inhibit an early step of HCV life cycle, without affecting replication or viral assembly/secretion. By RT-PCR-based quantification of the viral particles bound to the cell surface, we demonstrated that delphinidin chloride impairs the early attachment of the virus to the cell surface. Interestingly, delphinidin chloride is effective in combination with interferon or boceprevir to inhibit HCV infection in cell culture. Finally, with an IC<sub>50</sub> of 3.5 μM, delphinidin chloride is more potent than EGCG as an anti-HCV molecule.

**Conclusions.** Delphinidin chloride is a new inhibitor of HCV entry, exhibiting a similar mode of action as EGCG but with an increased efficacy.

## INTRODUCTION

Hepatitis C is a major healthcare problem worldwide caused by a viral infection with a high tendency to become chronic. Chronic hepatitis C is linked to the development of cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Currently, there is no vaccine against hepatitis C virus (HCV) and the high diversity of viral isolates will probably make it very difficult to develop a vaccine. The standard therapy, which is based on a combination of pegylated interferon alpha and ribavirin [1], results in highly variable outcome [2], is very expensive and has severe side effects. Nevertheless, it is currently thought that efficient anti-HCV therapies will be achieved with direct-acting antivirals (DAAs) [3]. The recent addition of protease inhibitors to the standard anti-HCV therapy has already improved sustained virological response rates in patients infected with genotype 1 HCV. New drugs targeting other viral proteins are in clinical trials and will probably also help improving HCV therapy [4,5]. A combination of DAAs will reduce the risk of selecting viral escape mutants. DAAs combinations in the absence of interferon will probably enable to greatly reduce side effects of the therapy, which are mainly associated with the use of interferon and contribute to the failure of the treatment. Ideally, such a combination should include DAAs targeting different steps of the HCV life cycle and should be efficient against all HCV genotypes.

In this context, the last few years have seen a flurry of reports on the identification of natural molecules of plant origin with anti-hepatitis C activities. EGCG is the most abundant flavonoid from the subclass of catechin present in green tea extract. It has been shown that a single cup of tea contains up to 150 mg of this molecule and its administration is safe in healthy individuals [6]. Very recently, we and others have independently identified EGCG as a new inhibitor of HCV entry [7-9]. Recently, Haid *et al.* by screening a library of natural phenolic compounds from plant extracts, have isolated ladanein (and its synthetic equivalent BJ486K), a molecule with anti-HCV activity, inhibiting entry [10]. HCV entry is a very complex process, which involves a series of host entry factors [11]. On the viral particle, envelope glycoproteins E1E2 play a major role during entry. The viral particle probably initially binds glycosaminoglycans (GAG) on the surface of the target cell. It has been proposed that interactions between the LDL receptor (LDL-R) and apolipoproteins of the viral particle might also participate in the initial binding to the cell surface. Following these rather non-specific initial binding events, several host entry factors are specifically involved in the entry process [12]. Our objective was to identify a molecule with increased anti-HCV inhibition capacity compared to EGCG.

## MATERIALS AND METHODS

**Chemicals.** Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), phosphate-buffered saline (PBS), glutamax-I, goat, and fetal calf sera were purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA). 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) was from Molecular Probes (Invitrogen). EGCG was from Calbiochem (Merck Chemicals, Darmstadt, Germany), gallic acid (GCG) was from Sigma (St. Louis, MO), delphinidin chloride, cyanidin, myrtillin chloride, pelargonidin chloride, tricetinidin chloride, myricetin and petunidin chloride were purchased from Extrasynthèse (Lyon, France). Stocks were resuspended in dimethylsulfoxide (DMSO) at 0.5 M. Boceprevir was kindly provided by Philippe Halfon (Hôpital Ambroise Paré, Marseille, France). Interferon and other chemicals were from Sigma (St. Louis, MO).

**Antibodies.** Mouse anti-E1 MAb A4 [13] was produced *in vitro*. Cy3-conjugated goat anti-mouse IgG was from Jackson Immunoresearch (West Grove, PA).

**Cells and culture conditions.** Huh-7 [14] and HEK 293T (ATCC number CRL-11268) cells were grown in DMEM supplemented with glutamax-I and 10% fetal calf serum.

**HCVcc.** We used a modified JFH1 virus containing titer-enhancing mutations [15] and in which the A4 epitope of HCV glycoprotein E1 of genotype 1a was reconstituted [16]. The JFH1-Luc plasmid containing a *Renilla* luciferase reporter gene, the JFH1-ΔE1E2-Luc or JFH1-ΔE1E2 plasmids, which contain an in-frame deletion in the E1E2 region, and the JFH1-GND-Luc replication-defective mutant have been described previously [16,17]. Infections were scored by measuring luciferase activity in cell lysates using a *Renilla* luciferase assay system from Promega (Madison, WI) or by measuring infectivity by indirect immunofluorescence with anti-E1 MAb. For quantitative binding experiments, purified virus was obtained by precipitation of HCVcc-infected Huh-7 cells supernatants with 8% polyethylene glycol 6000. Pelleted virus was then loaded onto a continuous 10-40% iodixanol gradient. One ml fractions were collected and the most infectious ones were pooled. The titer of the stock was  $5 \cdot 10^6$  focus forming unit (ffu)/ml.

**HCVpp.** The luciferase-based HCV pseudotyped retroviral particles (HCVpp) infection assay was as previously described [18].

**Quantification of HCV core protein.** Huh-7 cells were inoculated for 2 h with HCVcc in 35-mm wells of 6-well cell culture plates or electroporated with JFH1- $\Delta$ E1E2 RNA. HCV core antigen expressed within cells or secreted into the supernatant was quantified using chemiluminescent microparticle technology (Architect HCV Ag Test; Abbott, France) as described [19]. In parallel, total amounts of proteins in cell lysates were quantified using bicinchoninic acid assay (Sigma).

**Indirect immunofluorescence microscopy.** Infected cells grown onto glass coverslips were processed for immunofluorescent detection of viral proteins as previously described [20]. Nuclei were stained with 1  $\mu$ g/ml DAPI. Coverslips were observed with a Zeiss Axiophot microscope equipped with either 10 $\times$  or 20 $\times$  magnification objectives. Fluorescent signals were collected with a Coolsnap ES camera (Photometrix, Kew, Australia). For quantification, images of randomly picked areas from each coverslip were recorded.

**Viability assay.** Subconfluent cell cultures grown in 96-well plates were incubated in culture medium. An MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium] based viability assay (CellTiter 96 aqueous nonradioactive cell proliferation assay from Promega) was conducted as recommended by the manufacturer.

**Spectrophotometric quantification of delphinidin conversion.** A thermoregulated spectrophotometer was used to quantify delphinidin conversion in cell culture medium. The absorbance spectrum of a 50  $\mu$ M solution of delphinidin chloride in HEPES, pH 7.4 was recorded every 5 minutes. Delphinidin conversion was monitored by the decrease of the 500-650 nm peak over time.

**Quantitative binding assay.** Huh-7 cells were infected with purified HCVcc in 24-well plates for 1 h at 4°C in the presence of either DMSO, or 50  $\mu$ M EGCG, or 50  $\mu$ M delphinidin chloride, or 500  $\mu$ g/ml porcine intestinal heparin. Cells were washed with PBS and total RNA was extracted using NucleoSpin RNA II kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) according to the manufacturer's instructions. HCV RNA was quantified by quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay as described previously [21].

**Molecule combination studies.** Huh-7 cells were infected with HCVcc in 24-well plates in the presence of given concentrations of delphinidin chloride. The inoculum was removed and cells were overlaid with fresh medium containing different concentrations of boceprevir or interferon. After 34 h, infected cells grown onto glass coverslips were processed for immunofluorescent detection of viral proteins as previously described [20].

## RESULTS

### ***Delphinidin inhibits HCV infection more efficiently than EGCG.***

We recently demonstrated that EGCG inhibits HCV entry. In order to better understand the activity of the molecule and potentially find molecules with enhanced anti-HCV capacities, we tested the entry inhibition capacity of different natural polyphenol molecules structurally related to EGCG. Our previous study on different catechins highlighted the importance of the galloyl group in R3 and the hydroxyl group in R5' on HCV entry inhibition efficacy. Therefore, polyphenol molecules with different combinations of R3 and R5' residues were tested. Gallocatechin gallate (GCG, epimer of EGCG), cyanidin, tricetinidin, myricetin, petunidin and delphinidin, each of them displaying an hydroxyl group in R5' but harboring different chemical structure composition, and finally, myrtillin, a glycosylated form of delphinidin, naturally present in plant cell vacuoles, were challenged as new HCV inhibitors (**Figure S1**). Cells were infected by HCV in presence of each molecule at 50  $\mu$ M for 2 h, then the molecule was removed and infection monitored 34 h post-infection. Number of infected cells was quantified and compared to cells infected in presence of EGCG (**Figure 1A**). GCG exhibited similar infection inhibition than its epimer EGCG showing that the spatial orientation of the trihydroxyphenyl group is not crucial for HCV inhibition. Tricetinidin, myricetin and petunidin did not conduct to any inhibition of HCV infection. However, for delphinidin chloride, the inhibition of HCV infection was more than 90%, in the same range than EGCG. Finally, myrtillin, the delphinidin glycosylated form, was completely unable to inhibit HCV infection showing that the presence of the glucose in R3 impairs the efficacy of the delphinidin molecule. Taken together, these results show that delphinidin chloride is a new inhibitor of HCV infection.

To compare HCV inhibitory capacities of EGCG and delphinidin, IC<sub>50</sub> of delphinidin was calculated by inoculating Huh-7 cells in the presence of increasing concentrations of delphinidin during the 2-h inoculation step. Numbers of infected cells were quantified 34 h

post-infection by immunofluorescence (**Figure 1B**). Our results showed that  $IC_{50}$  of delphinidin is 3.5  $\mu\text{M}$  which is approximately 3 times less than  $IC_{50}$  of EGCG calculated in the same condition (11  $\mu\text{M}$ ).

#### ***Delphinidin and its conversion product inhibit HCV infection.***

To go further in the characterization of delphinidin, its cellular toxicity was determined (**Figure 2A**). Our results showed that delphinidin is not toxic at 50  $\mu\text{M}$ , even when present in the medium for 48 h.

The anthocyanidin delphinidin is a natural plant pigment colored in blue-purple. We observed that the blue-purple color of the delphinidin disappeared in approximately 2 h when added to the cell culture medium at 37°C, showing a potential conversion of the molecule in the culture medium. The disappearance of the molecule color in aqueous solution was confirmed by measuring optical density between 500 and 650 nm in a time course experiment at pH 7.4 and 37°C (**Figure 2B**). A time-dependent decrease of the absorbance peak of delphinidin chloride was observed, with an absence of detection of the molecule after 120 min. This experiment confirmed the instability of the molecule in aqueous solution [22].

In culture medium, delphinidin chloride is converted within approximately 2 h, but, as its mechanism of action against HCV is not known, its conversion product might also be active as an antiviral molecule. Thus, the anti-HCV effect of the delphinidin conversion product was monitored. Delphinidin chloride, at different concentrations, was incubated 1 h at 37°C in the cell culture medium prior to the inoculation step. Then, virus was added to the medium preincubated with the molecule and used to inoculate Huh-7 cells at 37°C for 2 h. The virus and the medium were removed and the number of infected cells was quantified 34 h post-inoculation by immunofluorescence (**Figure 2C**).  $IC_{50}$  of the conversion product was similar to  $IC_{50}$  of delphinidin chloride, showing that despite the disappearance of blue-purple color of delphinidin, the colorless conversion product present in the medium was also an active anti-HCV molecule (**Figure 2C**).

#### ***Delphinidin acts directly on HCV particle and inhibits entry at the binding step.***

We previously demonstrated that EGCG acts directly on HCV particle to inhibit entry and postulated that delphinidin might act in the same manner. To verify this hypothesis, HCV was preincubated with delphinidin chloride or EGCG at 50  $\mu\text{M}$  for 1 h prior to the inoculation step, and then the virus and the molecule were diluted 10 times during the inoculation period (at a final concentration of 5  $\mu\text{M}$ ). Infection was compared with the virus not preincubated

before infection with the molecule. Our results showed that the inhibitory effect of delphinidin is higher when the virus is first preincubated with the molecule prior to inoculation, demonstrating that, as shown for EGCG, delphinidin chloride acts directly on HCV particle (**Figure 3A**).

The previous data showed that delphinidin acts at the inoculation step, at an early step of the virus life cycle. To determine if delphinidin could impair HCV entry, HCV pseudoparticles (HCVpp) harboring E1E2 envelope proteins of different genotypes were produced and used to infect Huh-7 cells in the presence of 3.5  $\mu\text{M}$  and 35  $\mu\text{M}$  of delphinidin chloride. Our results showed that delphinidin inhibits HCVpp entry, regardless of the genotype, at the same concentration necessary to inhibit HCVcc infection (**Figure 3B**). However, some genotypes (5 and 6) seemed to be less sensitive to delphinidin. This observation might be due to the low luciferase activity detected for these two pseudotyped particles. These data confirmed that delphinidin acts on HCV entry and, as observed with EGCG, that the molecule is active in a genotype-independent manner.

The previous data showed that delphinidin acts at the entry step. To further characterize the anti-HCV inhibition effect of delphinidin, the molecule was added either before, during or after the inoculation step in 2-h periods. Infection was quantified 30 h post-inoculation. As shown in **Figure 3C**, delphinidin is active against HCV when added during the inoculation step. Additionally, the molecule might also act on the cell prior to inoculation. However, as the decrease in infection is low, this experiment is going to be performed by quantification of HCVcc infection by immunofluorescence (*to be done...*). Furthermore, the molecule is inactive when added after inoculation, confirming an action at the entry step. Altogether, these data show that delphinidin and EGCG have similar modes of action, and that delphinidin may have an additionnal effect on cells.

HCV entry step is a complex mechanism that can be divided in three different substeps, attachment to cellular factors, binding to specific receptors and endocytosis. To determine the step of entry impaired by delphinidin, a time addition assay was performed (**Figure 4A**). This experiment showed that the inhibitory activity of delphinidin occurs mainly at the binding step, with a lower inhibition at the post-binding step after removal of the inoculum, and that delphinidin is not active during endocytosis.

To confirm delphinidin action at the attachment step, HCV binding assays were performed by quantifying HCV RNA attached to the cell surface by quantitative RT-PCR. The binding step allowing attachment of the virus to the cell surface was performed by incubating purified virions with Huh-7 cells for 1 h at 4°C in the presence or absence of delphinidin.

Heparin, which was shown to inhibit binding, was added as a positive control, as well as EGCG for which we previously demonstrated an action on HCV binding. After incubation, unbound virions were washed and the attached viruses were measured by quantification of viral RNA (**Figure 4B**). Our results showed that delphinidin inhibits binding in the same range than EGCG. Taken together, these results showed that delphinidin inhibits HCV entry at the binding step.

***Delphinidin has no effect on viral replication or virus assembly/secretion.***

To determine if delphinidin chloride has additional effects on different steps of HCV life cycle, different experiments were performed to analyze the replication and the secretion/assembly steps. Huh-7 cells were electroporated with JFH1-Luc transcripts, and 50  $\mu$ M delphinidin chloride was added 4 h after electroporation. Luciferase activity was measured at 24 h, 48 h, and 72 h post-electroporation. Data presented in **Figure 5A** showed no effect of delphinidin on HCV replication. The analysis of HCV secretion in the presence of delphinidin chloride was realized by the quantification of intracellular and extracellular HCV core protein. No effect on extracellular core (right part of the graph) was observed, showing that delphinidin might not act at the assembly/secretion step (**Figure 5B**).

***Delphinidin chloride is effective in combination with interferon or boceprevir.***

The final goal of the identification of new DAAs, is to use them in combination with interferon or ribavirin, the standard therapy, or with other DAAs, like the new anti-HCV protease inhibitors, boceprevir or telaprevir. The idea is to decrease the dose of molecule administration to diminish side effects and cost of the treatment. To this aim, anti-HCV activity of delphinidin chloride combined with either interferon-alpha or boceprevir were performed. Huh-7 cells were inoculated with HCVcc in the presence of different concentrations of delphinidin chloride, then the virus and the molecule were removed and cell culture medium was added with interferon-alpha or boceprevir at different concentrations (**Figure 6A and 6B**, respectively). Our results showed that delphinidin chloride is effective in combination with either interferon-alpha or boceprevir in inhibiting HCV infection. (*Combination index calculation is under way in order to know if the effect is synergic or additive...*). Taken together, these results showed that delphinidin could be used in combination with boceprevir or interferon-alpha with an increased efficiency, showing its potential as a new anti-HCV agent.

## DISCUSSION

In this article, we identify a new inhibitor of HCV entry, delphinidin chloride, which might have some applications in HCV therapy. This polyphenolic component is a plant pigment that gives blue hues to flowers and can also be found in many fruits. Like the catechin EGCG, which has been recently identified by us and others as a new anti-HCV agent, the anthocyanidin delphinidin chloride, belongs to the flavonoid family but differs from some of them by the presence of a positive charge. Our results show that the trihydroxyphenyl group is important to confer its antiviral activity to delphinidin chloride. Furthermore, it seems that the hydroxyl group in R3 is also necessary, as the glycosylation of this residue completely abolishes, the antiviral activity of the molecule.

We demonstrated that delphinidin chloride acts at an early step of entry probably by inhibiting the docking of the virus to the cell surface but an additional effect on a later step of this process must be considered. Furthermore, our results suggest that delphinidin chloride acts both on the virion and on the target cells. Later entry steps like viral receptor interactions, endocytosis or membrane fusion could be directly affected.

Delphinidin chloride exhibits an antiviral activity against all HCV genotypes, tested in HCVpp system, increasing its potential interest as a general anti-HCV agent. In our hands, HCV replication and assembly were unaffected by the addition of the molecule in the cell culture medium. Since delphinidin chloride acts on the viral particle, and inhibits both HCVpp and HCVcc infection, it is reasonable to think that it might interfere with E1E2 function.

Interestingly, aqueous solutions of the anthocyanidin delphinidin tend to lose their bright color by formation of colorless species that still encompass anti-HCV activity similar to the native delphinidin chloride molecule against HCVcc, increasing the potential use of this molecule in HCV therapy. Further studies are needed to characterize the active colorless conversion product, that might, according to chemical reports, probably be a chalcone. The delphinidin chloride molecule can be used in combination with currently used replication inhibitors like interferon or boceprevir. This may potentiate its use in HCV therapy.

To envisage the use of this molecule in human therapy, further studies are needed and particularly safety and pharmacokinetics studies. To our knowledge, no data are available on the toxicity of anthocyanidins in humans and antiviral activities against any viruses have never been reported for these compounds.

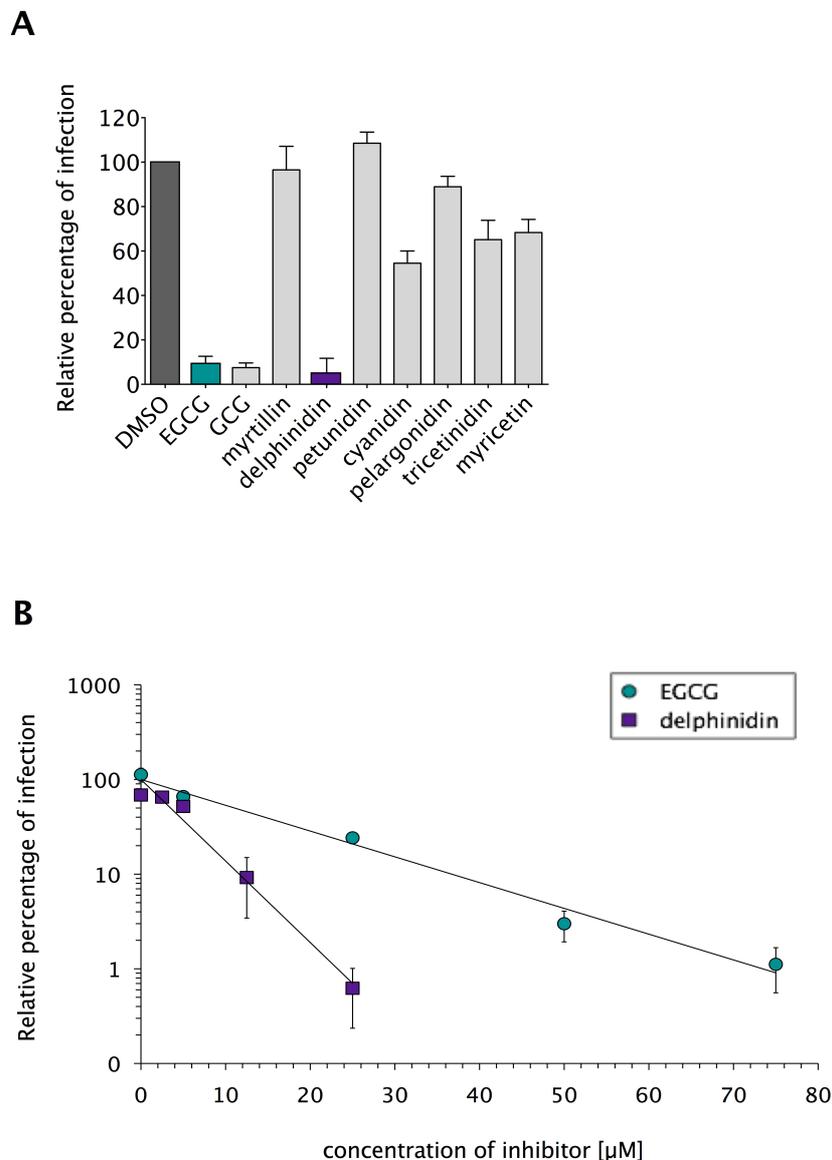
Cellular toxicity of delphinidin chloride is comparable to that of EGCG which was demonstrated to be safe in human at high concentrations. Pharmacokinetics studies have shown that anthocyanidins might be more bioavailable than anthocyanins, the glycosylated anthocyanidins, since those molecules do not possess a glucoside group which is responsible for the low bioavailability of anthocyanins. Routes of delphinidin chloride delivery might be investigated in order to determine its plasma concentration and its bioavailability. Alternatively, modifying the molecule to improve its bioavailability and antiviral activity might be necessary to establish delphinidin chloride as a potent antiviral drug in human therapy.

HCV entry is a crucial step for initiation, spread and maintenance of virus infection and represents an interesting target for antiviral therapy. Moreover, in the setting of liver transplantation for HCV associated end stage liver disease, the ability to block cell entry would help to minimize the universal re-infection of the donor liver by virions present in the blood which is always observed with an accelerated progression of liver disease. If the low toxicity of delphinidin chloride is confirmed *in vivo*, the hypothetical double mode of action of this molecule on HCV entry combined with its pan-genotypic activity must represent a major asset for an entry inhibitor. Furthermore, delphinidin chloride is readily available and cheap.

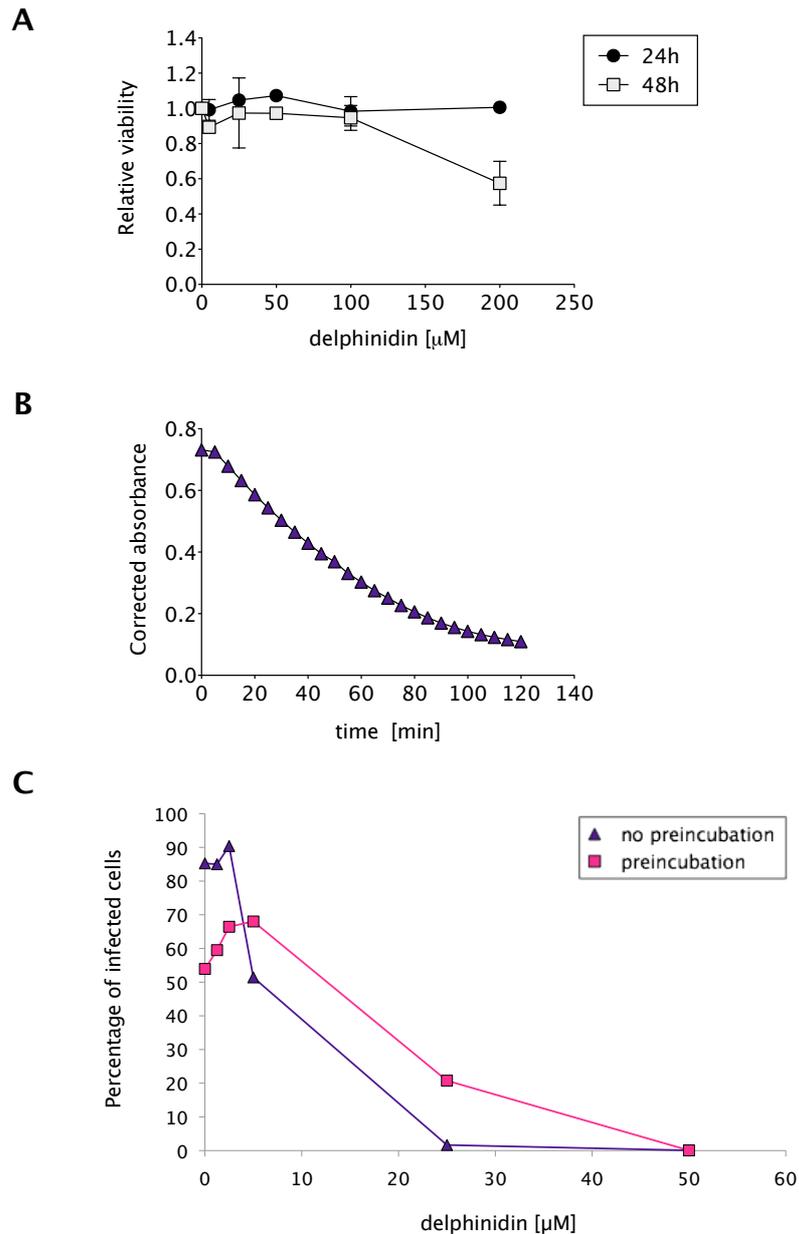
The first step of virus entry involves association of the virus with non-specific factors present at the surface of many different cell types. This step of the virus life cycle is still poorly defined and delphinidin chloride might be a new tool to go further in its characterization. More experiments will be necessary to determine if delphinidin interferes with these factors or if it acts at a different level.

The combination of entry, replication and polyprotein processing inhibitors in a context of a multidrug therapy might be the way to reduce the risk of emergence of resistant viruses. For all these reasons, after having tested its safety in primary human hepatocytes and in chimeric mouse models, it would be interesting to further evaluate the antiviral activity of delphinidin chloride in HCV infected patients.

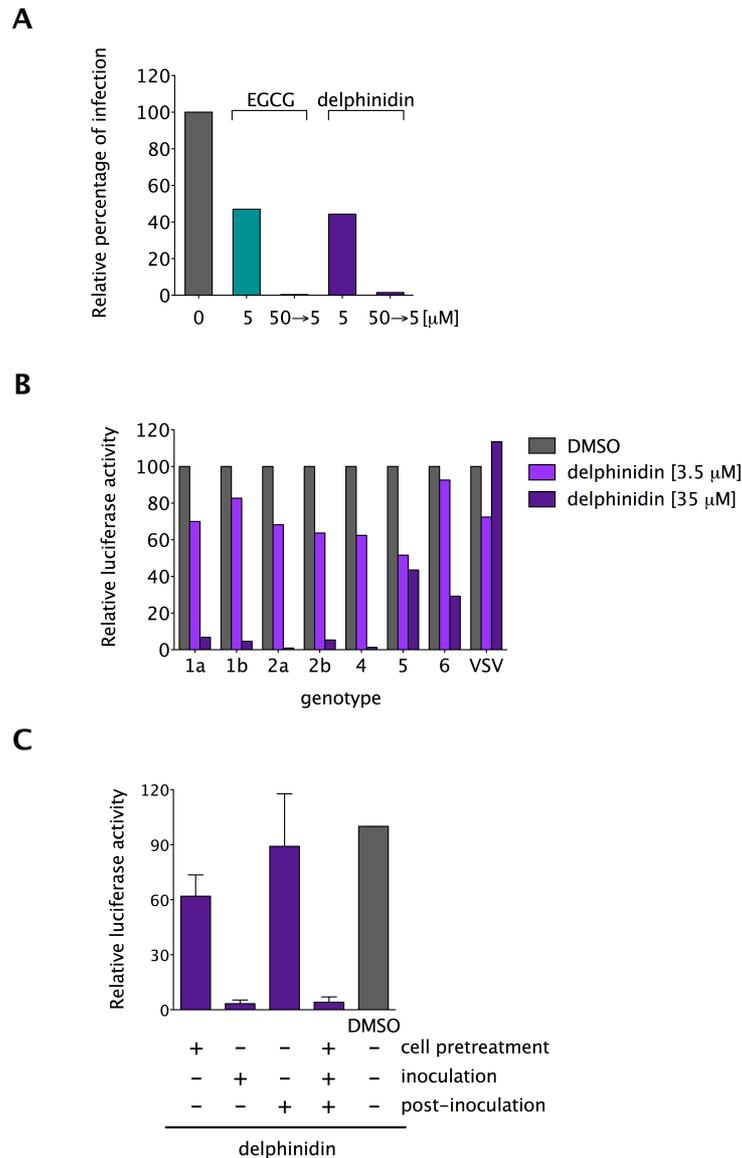
FIGURES



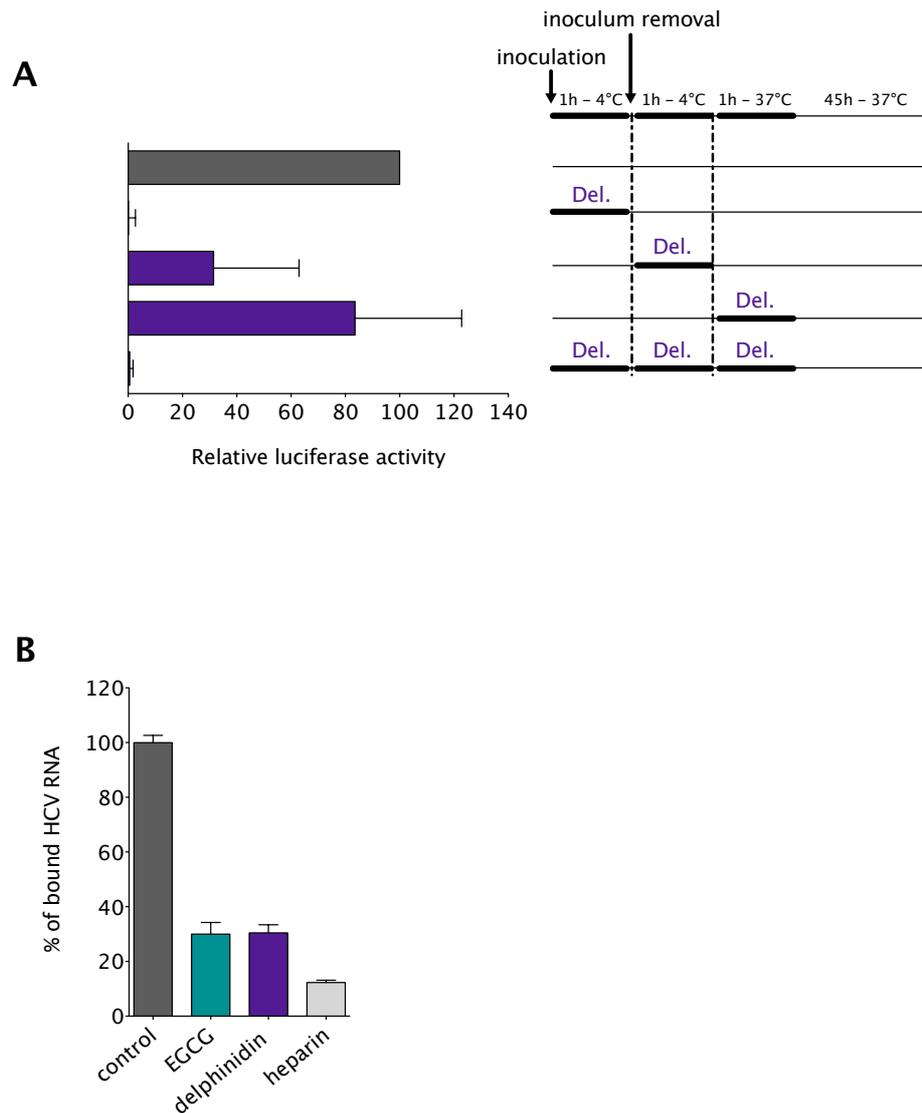
**Figure 1. Delphinidin inhibits HCVcc infection in a dose-dependent manner.** (A) Huh-7 cells were infected with HCVcc for 2 h in the absence or presence of 50  $\mu$ M of each molecule separately. Cells were further incubated in molecule-free medium for 34 h. Cells were fixed and infectivity quantified by immunofluorescence. (B) Huh-7 cells were infected with HCVcc for 2 h in the presence of given concentrations of delphinidin or EGCG and further incubated in molecule-free medium for 34 h. Cells were fixed and infectivity quantified by immunofluorescence. A trend curve was plotted from the quantification of immunofluorescences. A mathematical equation corresponding to this curve was obtained and was used to calculate the  $IC_{50}$  of each molecule.



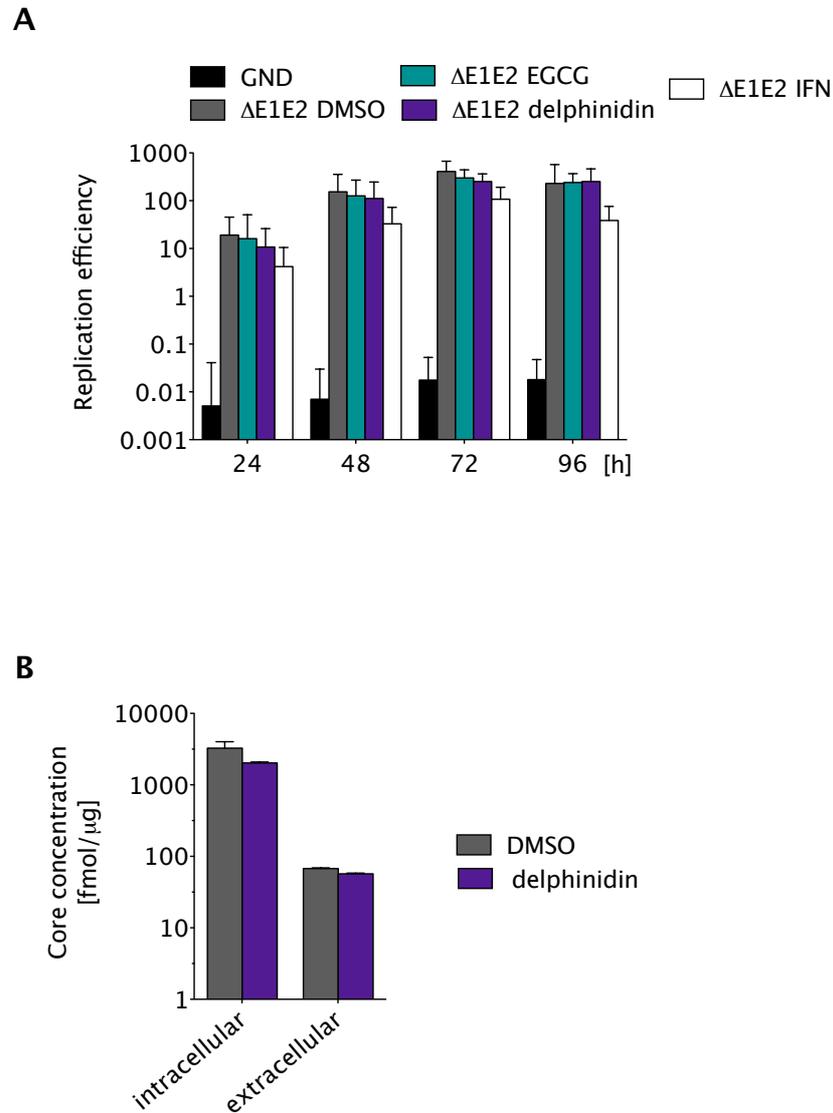
**Figure 2. Delphinidin and its conversion products are both active against HCVcc.** (A) Cells were cultured in the absence or presence of given concentrations of delphinidin. The viability was monitored using a MTS-based viability assay after 24 h and 48 h by determining the OD at 490 nm. (B) Delphinidin at 50  $\mu\text{M}$  in HEPES buffer was incubated at 37°C in the chamber of a thermoregulated spectrophotometer. The optical density between 500 and 650 nm was determined every 5 min. (C) Delphinidin was pre-incubated or not for 1 h at 37°C. In both cases, Huh-7 cells were infected with the virus in presence of different concentrations of delphinidin. 34 h post-infection, cells were fixed and infectivity was quantified by immunofluorescence.



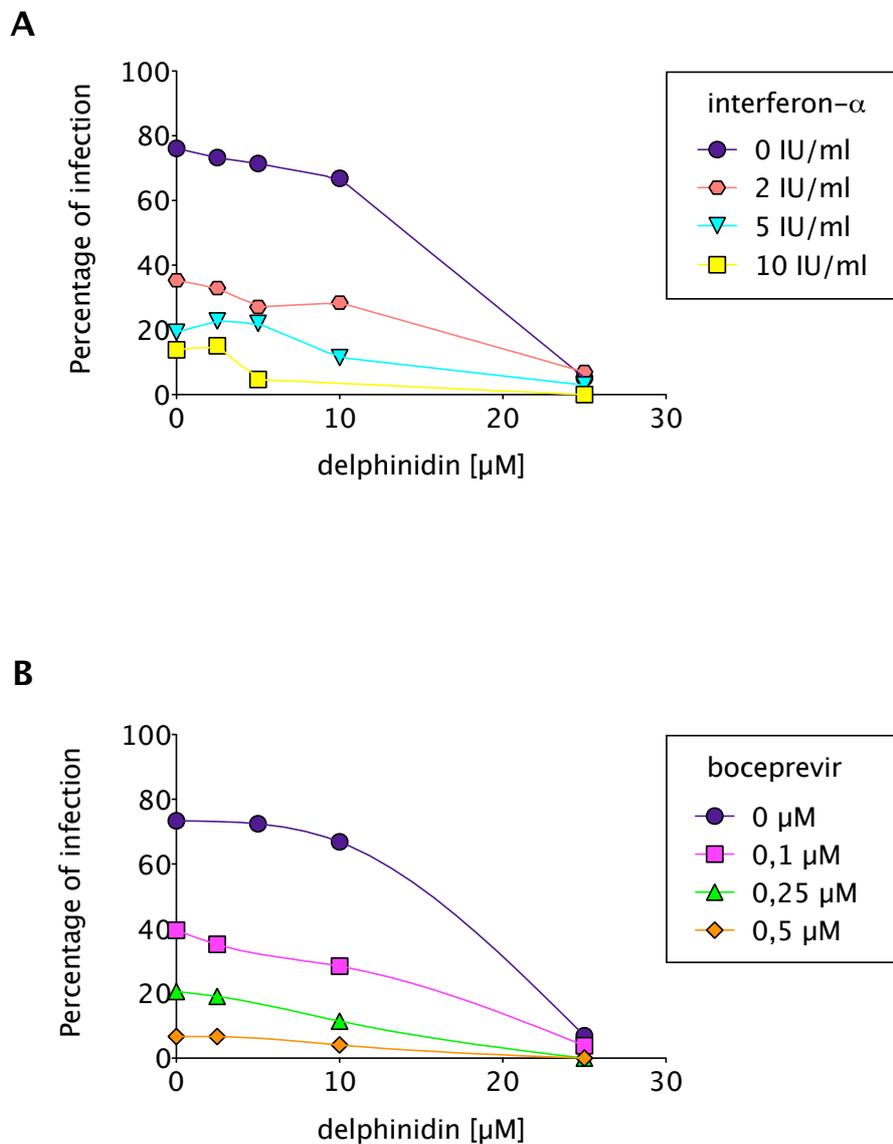
**Figure 3. Delphinidin acts directly on the virion to inhibit entry in a pan-genotypic manner.** (A) HCVcc was pretreated or not for 45 min with 50 μM delphinidin prior to inoculation. Huh-7 cells were then infected with treated or untreated virus. Infection with untreated virus was performed in the presence of 5 μM delphinidin (which corresponds to the final concentration of delphinidin during inoculation of treated virus). 46 h post-infection, cells were fixed and infectivity was quantified by immunofluorescence. (B) Huh-7 cells were infected with HCVpp of the indicated genotypes or with VSVpp for 2 h in the presence of DMSO or delphinidin. At 46 h post-infection, cells were lysed and luciferase activity quantified. (C) Delphinidin at 50 μM was added at different time points: before (cell pretreatment - 2 h), during (inoculation - 2 h) and after inoculation (post-inoculation - 2 h) of Huh-7 cells with JFH1-Luc. 46 h after infection, cells were lysed and luciferase activity quantified.



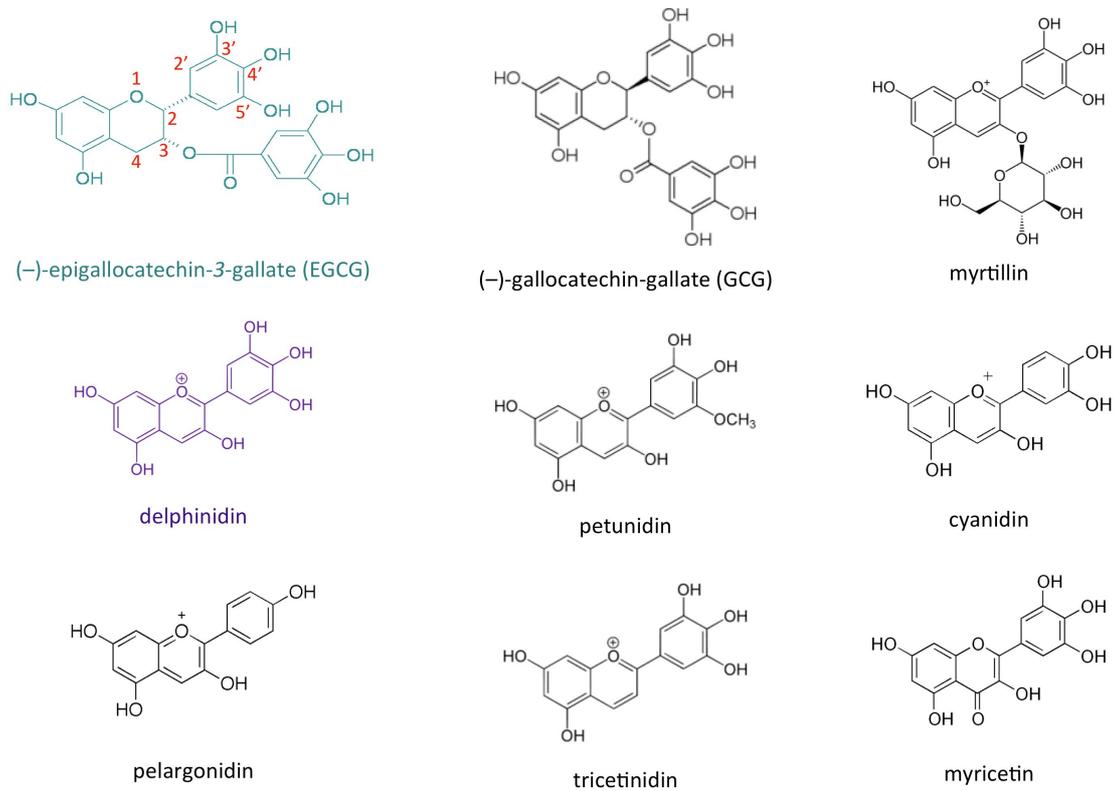
**Figure 4. Delphinidin inhibits HCVcc binding step.** (A) Infection of Huh-7 cells with JFH1-Luc was divided into three steps: a first one allowing attachment of the particle to the cell surface (1 h - 4°C), a second step permitting the attached virion to further bind to its receptors (1 h - 4°C), and a third step allowing endocytosis and fusion of virus with cellular membranes (1 h - 37°C). 46 h after infection, cells were lysed and luciferase activity quantified. (*Del.* means delphinidin). (B) Huh-7 cells were inoculated with purified HCVcc at a MOI of 10 for 1 h at 4°C in the presence of DMSO, 50 µM EGCG, 50 µM delphinidin or 500 µg/ml heparin. Total RNA was extracted. Bound HCV virions were detected by quantification of HCV genomic RNA by qRT-PCR.



**Figure 5. Delphinidin does not inhibit HCVcc replication or egress.** (A) JFH1-Luc RNA was electroporated in Huh-7 cells. At 4 h post-electroporation, molecules (50  $\mu$ M EGCG, 50  $\mu$ M delphinidin and 2 IU/ml IFN) were added or not to the culture medium. Cells were lysed at given time points post-electroporation. (B) Cells were inoculated with HCVcc for 2 h and cultured in the absence or presence of 50  $\mu$ M delphinidin for 70 h. Supernatants were collected, cells were lysed and amounts of intracellular and extracellular core protein were measured.



**Figure 6. Delphinidin is effective in combination with interferon and boceprevir.** Huh-7 cells were inoculated with HCVcc in the presence of five different concentrations of delphinidin. The inoculum was removed after 2 h and cells were washed three times with fresh medium. Then, cells were overlaid with fresh medium containing either boceprevir (A) or interferon-alpha (B) in increasing concentrations. Infected cells were fixed 34 h post-infection and infectivity was determined by immunofluorescence.



**Figure S1. Schematic representation of the different molecules.**

## REFERENCES

- 1 McHutchison JG, Gordon SC, Schiff ER, *et al.* Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. *New England Journal of Medicine*. 1998; **339**: 1485-92.
- 2 Di Bisceglie AM, Hoofnagle JH. Optimal therapy of hepatitis C. *Hepatology*. 2002; **36**: S121-S127.
- 3 Hofmann WP, Zeuzem S. A new standard of care for the treatment of chronic HCV infection. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*. 2011; **8**: 257-264.
- 4 Poordad F, Dieterich D. Treating hepatitis C: current standard of care and emerging direct-acting antiviral agents. *Journal of Viral Hepatitis*. 2012; **19**: 449-464.
- 5 Wartelle-Bladou C, Le Folgoc G, Bourlière M, *et al.* Hepatitis C therapy in non-genotype 1 patients: the near future. *Journal of Viral Hepatitis*. 2012; **19**: 525-536.
- 6 Chow HHS, Cai Y, Hakim IA, *et al.* Pharmacokinetics and safety of green tea polyphenols after multiple-dose administration of epigallocatechin gallate and polyphenon E in healthy individuals. *Clinical Cancer Research*. 2003; **9**: 3312-3319.
- 7 Ciesek S, Hahn von T, Colpitts CC, *et al.* The green tea polyphenol, epigallocatechin-3-gallate, inhibits hepatitis C virus entry. *Hepatology*. 2011; **54**: 1947-1955.
- 8 Calland N, Albecka A, Belouzard S, *et al.* (-)-Epigallocatechin-3-gallate is a new inhibitor of hepatitis C virus entry. *Hepatology*. 2012; **55**: 720-729.
- 9 Chen C, Qiu H, Gong J, *et al.* (-)-Epigallocatechin-3-gallate inhibits the replication cycle of hepatitis C virus. *Archives of Virology*. 2012; **157**: 1301-1312.
- 10 Haid S, Novodomská A, Gentsch J, *et al.* A plant-derived flavonoid inhibits entry of all HCV genotypes into human hepatocytes. *Gastroenterology*. 2012; **143**: 213-215.
- 11 Belouzard S, Cocquerel L, Dubuisson J. Hepatitis C virus entry into the hepatocyte. *Central European Journal of Biology*. 2011; **6**:1-13.
- 12 Meredith LW, Wilson GK, Fletcher NF, *et al.* Hepatitis C virus entry: beyond receptors. *Reviews in Medical Virology*. 2012; **22**: 182-193.
- 13 Dubuisson J, Hsu HH, Cheung RC, *et al.* Formation and intracellular localization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia and Sindbis viruses. *Journal of Virology*. 1994; **68**: 6147-6160.
- 14 Nakabayashi H, Taketa K, Miyano K, *et al.* Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Research*. 1982; **42**: 3858-3863.

- 15 Delgrange D, Pillez A, Castelain S, *et al.* Robust production of infectious viral particles in Huh-7 cells by introducing mutations in hepatitis C virus structural proteins. *Journal of General Virology*. 2007; **88**: 2495-2503.
- 16 Goueslain L, Alsaleh K, Horellou P, *et al.* Identification of GBF1 as a cellular factor required for hepatitis C virus RNA replication. *Journal of Virology*. 2010; **84**: 773-787.
- 17 Rocha-Perugini V, Montpellier C, Delgrange D, *et al.* The CD81 partner EWI-2wint inhibits hepatitis C virus entry. *PLoS ONE*. 2008; **3**: e1866.
- 18 Keck Z-Y, 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. *Journal of Virology*. 2004; **78**: 9224-9232.
- 19 Alsaleh K, Delavalle P-Y, Pillez A, *et al.* Identification of basic amino acids at the N-terminal end of the core protein that are crucial for hepatitis C virus infectivity. *Journal of Virology*. 2010; **84**: 12515-12528.
- 20 Rouillé Y, Helle F, Delgrange D, *et al.* Subcellular localization of hepatitis C virus structural proteins in a cell culture system that efficiently replicates the virus. *Journal of Virology*. 2006; **80**: 2832-2841.
- 21 Castelain S, Descamps V, Thibault V, *et al.* TaqMan amplification system with an internal positive control for HCV RNA quantitation. *Journal of Clinical Virology*. 2004; **31**: 227-234.
- 22 Brouillard R, Chassaing S, Isorez G. The visible flavonoids or anthocyanins: from research to applications. *Recent Advances in Polyphenol Research*. 2010; **2**: chapter 1.

*DISCUSSION*

-

*PERSPECTIVES*

-

*CONCLUSIONS*



### **Résumé des résultats**

Notre étude montre que l'EGCG et la delphinidine inhibent, de manière indépendante du génotype, l'entrée du HCV dans la cellule. Plus précisément, ces molécules interfèrent avec l'attachement de la particule virale à la surface cellulaire en agissant directement sur le virion. De plus, ces deux molécules n'affectent ni l'étape de réplication, ni l'étape d'assemblage/maturation. Enfin, l'EGCG inhibe la transmission du virus de cellule à cellule et élimine le virus présent dans le surnageant de culture cellulaire après quelques passages successifs sur des cellules naïves. Par conséquent, nos résultats préliminaires suggèrent que ces deux molécules peuvent interagir directement avec la particule virale *via* les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 ou bien *via* la partie lipidique de la lipoprotéine. Cette interaction, si elle existe, peut, soit empêcher l'interaction du virus avec les facteurs d'entrée (GAG, LDL-R, ...), soit modifier l'intégrité du virion.

### **L'épigallocatechine-3-gallate, la delphinidine et l'entrée virale**

Plusieurs études ont montré que l'EGCG pouvait interagir avec certains récepteurs cellulaires (Tachibana *et al.*, 2004 ; Li *et al.*, 2006). Dans le cadre d'une infection par le HCV, le mécanisme d'entrée fait intervenir de manière séquentielle plusieurs facteurs d'attachement et récepteurs. Ainsi, cette molécule, en plus d'agir sur la particule virale, pourrait agir sur les récepteurs présents à la surface de la cellule. Cependant, une autre équipe a montré que cette molécule n'affectait pas l'expression des récepteurs CLDN-1, OCLDN, SR-BI et CD81 (Ciesek *et al.*, 2011). Cet argument est donc en faveur d'une action directe de l'EGCG sur la particule virale. Toutefois, le rôle de l'EGCG sur les facteurs d'attachement n'ayant jamais été investigué, nous pouvons supposer une action inhibitrice de l'EGCG, par liaison de cette dernière à la surface des GAG ou du LDL-R (comme pour ce qui a été montré pour le HIV (Kawai *et al.*, 2003), avec le récepteur CD4). Cependant, nos résultats montrent clairement que le prétraitement des cellules avec cette molécule, avant l'infection, n'a pas d'effet et que ce flavonoïde cible préférentiellement la particule virale.

De manière intéressante, le chlorure de delphinidine semble avoir un effet sur l'infection lorsque les cellules sont prétraitées avec cette molécule avant l'infection. Ainsi, cette molécule, en plus de cibler directement la particule virale, pourrait également exercer un effet sur la cellule. Ainsi, si cette double spécificité d'action est confirmée, l'utilisation de cette molécule comme nouvel agent antiviral augmenterait les chances de prévenir l'infection du HCV dans la cellule.

### **L'épigallocatechine-3-gallate et la réplication**

L'absence d'effet de l'EGCG sur la réplication peut être discuté. En effet, Chen *et al.* (Chen *et al.*, 2012), contrairement à Ciesek *et al.* (Ciesek *et al.*, 2011) et notre équipe (Calland *et al.*, 2012), ont montré un effet inhibiteur de cette molécule sur cette étape. De plus, des études précédentes ont montré que l'EGCG inhibait la sérine protéase du HCV et la chaperone Hsp90, deux protéines requises lors de la réplication du HCV (Okamoto *et al.*, 2006 ; Zuo *et al.*, 2007 ; Yin *et al.*, 2009). Cependant, certaines de ces données sont à reconsidérer puisque certaines expériences ont été réalisées dans des systèmes acellulaires (Zuo *et al.*, 2007). Ainsi, il serait important de confirmer ces résultats en utilisant des systèmes *in vitro* et *in vivo* impliquant des modèles cellulaires. Néanmoins, les différents résultats obtenus pourraient être expliqués par l'utilisation de systèmes de détection de l'infection différents et donc de sensibilité de détection différente.

### **Action de l'EGCG et de la delphinidine sur le HCV**

La spécificité d'action de l'EGCG semble être spécifique du HCV. En effet, cette molécule ne constitue pas un agent antiviral universel car ce flavonoïde n'a pas d'effet, ni sur le virus de la fièvre jaune (*yellow fever virus* ou YFV), ni sur le virus de la diarrhée bovine (*bovine virus diarrhea virus* ou BVDV), deux autres virus appartenant à la famille des *Flaviviridae*. Ainsi, l'efficacité de cette molécule n'est pas applicable à tous les virus. Il serait également intéressant de vérifier la spécificité d'action de la delphinidine puisque aucune donnée concernant l'effet antiviral de cette molécule n'a encore été rapporté.

Dans le système HCVcc, les glycoprotéines d'enveloppe associées au virus, forment d'importants complexes stabilisés par des ponts disulfure (Vieyres *et al.*, 2010). Ainsi, par analogie à ce qui a été observé pour le virus HSV, nous pouvons supposer que l'EGCG induit des remaniements importants au niveau de ces complexes. La conformation de ces derniers étant importante pour le processus d'entrée, cette déstructuration pourrait perturber l'interaction du virus avec les récepteurs présents à la surface cellulaire. De la même manière, par analogie du mode d'action entre l'EGCG et la delphinidine, nous pouvons supposer que cette dernière induise les mêmes effets.

Comme nous l'avons mentionné précédemment, l'EGCG pourrait également agir sur la partie lipoprotéique de la particule virale. Cependant, des données préliminaires récentes montrent que cette dernière n'aurait pas d'effet sur les lipides (Schang, HCV 2012).

## **Utilisation de l'EGCG et de la delphinidine comme traitement antiviral contre l'hépatite C**

Différents facteurs sont à prendre en considération concernant la bioactivité de l'EGCG. En effet, cette molécule n'est pas très biodisponible et n'est pas bien absorbée au niveau du petit intestin (Yang *et al.*, 1998 ; Ullmann *et al.*, 2003). Ainsi, afin d'améliorer la biodisponibilité de l'EGCG, nous pouvons envisager de modifier chimiquement cette molécule. En effet, il semble que la modification de certains groupements (Furuta *et al.*, 2007 ; Mori *et al.*, 2008) augmente l'efficacité de cette molécule *in vitro*, laissant supposer une meilleure bioactivité *in vivo* (restant toutefois à confirmer).

De plus, l'EGCG inhibe également l'entrée du virus dans les hépatocytes primaires (Ciesek *et al.*, 2011). Cependant, les concentrations utilisées sont supérieures à celles utilisées dans le système *in vitro* (avec les cellules Huh-7), indiquant que cette molécule doit être modifiée chimiquement afin d'être plus biodisponible.

De manière intéressante, l'EGCG inhibe la transmission du virus de cellule à cellule. Ce point a été confirmé indépendamment par plusieurs équipes, en utilisant différentes méthodes (Ciesek *et al.*, 2011 ; Calland *et al.*, 2012 ; Chen *et al.*, 2012). Cette propriété constitue un atout majeur concernant l'utilisation de cette molécule dans le cadre de la transplantation hépatique. En effet, lors d'une greffe hépatique, le greffon est rapidement réinfecté par les virions circulants présents chez le receveur. Ainsi, l'utilisation de cette molécule dans le cadre des greffes hépatiques pourrait constituer un bon moyen de lutte contre la ré-infection systématique du greffon. De même, en potentialisant l'effet d'autres DAAs (Ciesek *et al.*, 2011), cette molécule pourrait aider à réduire le coût de la thérapie anti-HCV.

La charge positive que possède la delphinidine pose problème quant au passage des membranes par cette molécule. Ainsi, cette molécule, afin d'être biodisponible et active, devra, soit être administrée sous forme de pro-drogue, qui, suite à l'action d'enzymes résidentes dans le foie, sera clivée pour donner la forme active (le chlorure de delphinidine) ou soit devra être administrée sous une forme complexée à l'ion chlorure, ce qui pourrait contrebalancer cette charge positive et donc rendre cette molécule plus biodisponible. Cette molécule pourra également être directement injectée dans le foie ou par voie intraveineuse.

La delphinidine, si cette molécule s'avère plus biodisponible que l'EGCG, pourrait également être utilisée comme nouveau traitement contre le HCV du fait de son efficacité exacerbée *in vitro* en combinaison avec les inhibiteurs de l'arsenal thérapeutique anti-HCV.

Toutefois, du fait de l'absence de données *in vivo*, chez l'homme et la souris, des études devront être entreprises afin d'évaluer le potentiel de cette molécule dans de tels systèmes.

L'infection chronique par le HCV est associée à environ 30% des cancers du foie dans le monde et est une indication majeure pour la transplantation hépatique (Brown, 2005). Les individus subissant une transplantation hépatique se trouvent face à une ré-infection universelle et rapide du greffon. Dans le cas d'une transplantation hépatique pour un stade avancé de la maladie, la capacité à bloquer l'entrée virale pourrait aider à minimiser la ré-infection universelle actuelle du foie du donneur par les virions circulants présents dans le sang du receveur. Ainsi, l'EGCG ou la delphinidine, en inhibant fortement l'entrée du HCV, pourraient constituer une partie de la stratégie antivirale pour la prévention de la ré-infection du greffon par HCV après une transplantation hépatique.

### **Hypothèses concernant le mécanisme d'action de l'EGCG et de la delphinidine**

Ainsi, concernant le mode d'action de ces deux molécules sur la particule virale, trois hypothèses peuvent être émises. Notons que ces dernières sont basées sur des résultats obtenus avec des études impliquant l'EGCG. Toutefois, présentant un mode d'action comparable à celui de l'EGCG, nous pensons que ces hypothèses sont extrapolables à la delphinidine. Tout d'abord, nous pouvons supposer que ces molécules affectent l'intégrité de la particule virale en ciblant les glycoprotéines virales de l'enveloppe (Isaacs *et al.*, 2008). Dans un deuxième temps, nous pouvons supposer que ces flavonoïdes induisent une agrégation des particules entre elles (Nakayama *et al.*, 1993). Enfin, nous pouvons supposer que l'EGCG et la delphinidine forment une cage autour de la particule virale.

### **Perspectives**

Les perspectives vont consister à comprendre les mécanismes d'action de l'EGCG et de la delphinidine sur le HCV. Etant donné l'effet de l'EGCG et de la delphinidine sur les HCVpp et les HCVcc, il est probable que ces molécules antivirales interagissent avec les protéines d'enveloppe virales. Des interactions directes de l'EGCG et de la delphinidine avec les glycoprotéines d'enveloppe seront donc recherchées. La glycoprotéine d'enveloppe E2 étant la protéine virale impliquée dans l'attachement, nous nous concentrerons sur celle-ci dans un premier temps afin de déterminer son interaction potentielle avec l'EGCG et la delphinidine.

Toutefois, nous pouvons également envisager une action de l'EGCG sur la partie lipoprotéique de la particule virale dans le système HCVcc. En effet, des différences de mécanismes ne peuvent pas être exclues entre les HCVpp et les HCVcc, étant donné la différence de structure et de composition de ces deux types de particules. Il pourrait y avoir un effet sur les protéines d'enveloppe E1 et E2 (visible sur les HCVpp) et un effet additionnel sur les HCVcc. Étant donné la particularité du HCV de former une lipovirion, la partie lipoprotéique de la particule virale HCVcc pourrait en effet être impliquée dans une étape initiale de l'entrée virale et un effet de l'EGCG sur la lipoprotéine associée à la particule virale ne peut être exclu. Nous testerons donc l'effet de l'EGCG sur d'autres composants des HCVcc et notamment l'apolipoprotéine ApoE associée à la partie lipidique de la particule. Pour tester cette hypothèse, des expériences ont d'ores et déjà été entreprises, consistant à immunoprécipiter du virus purifié avec des anticorps anti-ApoE. Le virus a été détecté par évaluation de l'ARN viral par RT-PCR quantitative en temps réel. Nos résultats préliminaires semblent montrer que l'EGCG n'affecte pas la liaison des anticorps avec la protéine ApoE, suggérant que l'ApoE n'est pas la cible de l'EGCG. Toutefois, l'anticorps utilisé est un anticorps polyclonal et par conséquent ce dernier reconnaît plusieurs épitopes de l'ApoE. Ainsi, ces résultats devront être confirmés.

Afin d'aborder l'hypothèse concernant l'intégrité de la particule virale en présence des différentes molécules, des expériences de cryomicroscopie électronique seront réalisées. Cependant, étant donné les difficultés à visualiser avec certitude les particules HCVcc en microscopie électronique, cette étude sera réalisée avec les HCVpp, incubées en présence des molécules. Une autre approche envisagée permettant d'établir une action de l'EGCG sur l'intégrité de la particule virale sera de réaliser des tests de protection du génome viral à la RNase. Le virus purifié, incubé ou non avec les molécules, sera mis en présence de RNase. Si l'enveloppe virale est altérée par ces flavonoïdes, le génome viral sera exposé à la RNase et donc dégradé. En revanche, si la particule est intacte, le génome viral sera protégé et ainsi « résistera » à la RNase. Ces expériences seront donc complémentaires aux expériences de cryomicroscopie électronique réalisées avec les HCVpp. Des résultats préliminaires tentent à montrer que l'intégrité du virus est conservée en présence d'EGCG.

Afin d'appréhender l'hypothèse de l'agrégation des particules, nous envisageons de réaliser des expériences de gradients de sédimentation. En effet, si les particules sont agrégées, elles seront plus lourdes et migreront plus vite dans le gradient que les particules isolées. Par la suite, l'ARN viral sera quantifié et le titre infectieux déterminé dans chacune des fractions. Les protéines virales seront également détectées par Western blot. Ces

expériences devraient nous permettre de mettre en évidence l'agrégation des particules virales en présence de chacun des flavonoïdes. Des résultats préliminaires tendent à montrer que l'EGCG n'agrègerait pas les particules virales entre elles.

Ainsi, ces travaux nous permettront de caractériser le mécanisme d'inhibition de l'entrée du HCV par l'EGCG et la delphinidine. Ils nous permettront d'identifier les interactions virus-récepteur qui sont affectées par ces molécules. Ils nous aideront à caractériser l'interaction potentielle de ces deux flavonoïdes avec les glycoprotéines d'enveloppe du HCV. Ils nous indiqueront également si ces molécules interagissent avec la partie lipoprotéique de la particule. Enfin, ils nous permettront de déterminer si ces molécules ont des effets sur l'intégrité de la particule virale. L'ensemble de ces résultats devrait conduire à une meilleure compréhension de l'étape précoce de l'entrée cellulaire du HCV. De plus, cette connaissance pourra également être mise à profit pour la conception de molécules antivirales ciblant spécifiquement cette étape.

En résumé, l'EGCG, une molécule du thé vert et la delphinidine, un colorant naturel, inhibent l'entrée du HCV indépendamment du génotype viral, dans les cellules Huh-7 et dans les hépatocytes primaires, en bloquant l'attachement viral. Ces nouveaux inhibiteurs pourraient constituer une nouvelle approche pour prévenir la ré-infection due au HCV, plus particulièrement dans le cadre d'une transplantation hépatique de patients chroniquement infectés.

## **Conclusion**

**En conclusion, nos résultats montrent que l'EGCG et la delphinidine, deux molécules naturelles appartenant à la famille des flavonoïdes, inhibent une étape très précoce de l'entrée du HCV. Après optimisation par des modifications chimiques, nous supposons que ces molécules pourraient être utilisées en combinaison avec l'arsenal thérapeutique anti-HCV afin de potentialiser l'effet de ce dernier et diminuer son coût. De plus, du fait de leur mode d'action unique, ces flavonoïdes pourraient, suite à une transplantation hépatique, prévenir la ré-infection des greffes par le HCV. De même, en plus de leur potentiel thérapeutique, ces molécules présentent un grand intérêt concernant l'étude des mécanismes d'entrée du HCV dans la cellule hôte. En effet, cette étape du cycle viral reste encore mal comprise. Ainsi, l'utilisation de ces molécules pourrait permettre de décortiquer les mécanismes impliqués dans l'entrée virale du HCV. Toutefois, il est nécessaire d'être prudent concernant l'extrapolation des données**

**obtenues *in vitro*. Ainsi, à moyen et à long termes, des études cliniques chez l'homme seront nécessaires afin de valider l'utilisation de ces molécules. Néanmoins, en raison de leur abondance dans les plantes et les fruits consommés par l'homme et de leurs bénéfices potentiels pour la santé humaine, les flavonoïdes font l'objet d'une attention croissante.**



# *BIBLIOGRAPHIE*



**A**

**Abraham, J.D., N. Himoudi, F. Kien, J.L. Berland, A. Codran, B. Bartosch, T. Baumert, G. Paranhos-Baccala, C. Schuster, G. Inchauspé, and M.P. Kieny. 2004.** Comparative immunogenicity analysis of modified vaccinia Ankara vectors expressing native or modified forms of hepatitis C virus E1 and E2 glycoproteins. *Vaccine*. **22**:3917-3928.

**Acton, S., A. Rigotti, K.T. Landschulz, S. Xu, H.H. Hobbs, and M. Krieger. 1996.** Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science*. **271**:518-520.

**Acton, S.L., P.E. Scherer, H.F. Lodish, and M. Krieger. 1994.** Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger receptor. *Journal of Biological Chemistry*. **269**:21003-21009.

**Agnello, V., G. Abel, M. Elfahal, G.B. Knight, and Q.X. Zhang. 1999.** Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low-density lipoprotein receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **96**:12766-12771.

**Aherne, S.A., and N.M. O'Brien. 2002.** Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition*. **18**:75-81.

**Akazawa, D., T. Date, K. Morikawa, A. Murayama, M. Miyamoto, M. Kaga, H. Barth, T.F. Baumert, J. Dubuisson, and T. Wakita. 2007.** CD81 expression is important for the permissiveness of Huh7 cell clones for heterogeneous hepatitis C virus infection. *Journal of Virology*. **81**:5036-5045.

**Albecka, A., R. Montserret, T. Krey, A.W. Tarr, E. Diesis, J.K. Ball, V. Descamps, G. Duverlie, F. Rey, F. Penin, and J. Dubuisson. 2011.** Identification of new functional regions in hepatitis C virus envelope glycoprotein E2. *Journal of Virology*. **85**:1777-1792.

**Albecka, A., S. Belouzard, A. Op De Beeck, V. Descamps, L. Goueslain, J. Bertrand-Michel, F. Tercé, G. Duverlie, Y. Rouillé, and J. Dubuisson. 2012.** Role of low-density lipoprotein receptor in the hepatitis C virus life cycle. *Hepatology*. **55**:998-1007.

**Allander, T., A. Beyene, S.H. Jacobson, L. Grillner, and M.A. Persson. 1997.** Patients infected with the same hepatitis C virus strain display different kinetics of the isolate-specific antibody response. *Journal of Infectious Diseases*. **175**:26-31.

**Alsaleh, K., P.Y. Delavalle, A. Pillez, G. Duverlie, V. Descamps, Y. Rouillé, J. Dubuisson, and C. Wychowski. 2010.** Identification of basic amino acids at the N-terminal end of the core protein that are crucial for hepatitis C virus infectivity. *Journal of Virology*. **84**:12515-12528.

**Alter, H.J., P.V. Holland, A.G. Morrow, R.H. Purcell, S.M. Feinstone, and Y. Moritsugu. 1975.** Clinical and serological analysis of transfusion-associated hepatitis. *Lancet*. **2**:838-841.

**Alter, H.J., R.H. Purcell, P.V. Holland, and H. Popper. 1978.** Transmissible agent in non-A, non-B hepatitis. *Lancet*. **1**:459-463.

**Alter, H.J., and M. Houghton. 2000.** Hepatitis C virus and eliminating post-transfusion hepatitis. *Nature Medicine*. **6**:1082-1086.

**André, P., F. Komurian-Pradel, S. Deforges, M. Perret, J.L. Berland, M. Sodoyer, S. Pol, C. Bréchet, G. Paranhos-Baccalà, and V. Lotteau. 2002.** Characterization of low- and very low-density hepatitis C virus RNA-containing particles. *Journal of Virology*. **76**:6919-6928.

**Andréo, U., P. Maillard, O. Kalinina, M. Walic, E. Meurs, M. Martinot, P. Marcellin, and A. Budkowska. 2007.** Lipoprotein lipase mediates hepatitis C virus (HCV) cell entry and inhibits HCV infection. *Cellular Microbiology*. **9**:2445-2456.

**Appel, N., T. Pietschmann, and R. Bartenschlager. 2005.** Mutational analysis of hepatitis C virus nonstructural protein 5A: potential role of differential phosphorylation in RNA replication and identification of a genetically flexible domain. *Journal of Virology*. **79**:3187-3194.

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

**Aron, P.M., and J.A. Kennedy. 2008.** Flavan-3-ols: nature, occurrence and biological activity. *Molecular Nutrition and Food Research*. **52**:79-104.

**Assis, D.N., and J.K. Lim. 2012.** New pharmacotherapy for hepatitis C. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. **92**:294-305.

**Astill, C., M.R. Birch, C. Dacombe, P.G. Humphrey, and P.T. Martin. 2001.** Factors affecting the caffeine and polyphenol contents of black and green tea infusions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **49**:5340-5347.

## **B**

**Bacon, B.R., S.C. Gordon, E. Lawitz, P. Marcellin, J.M. Vierling, S. Zeuzem, F. Poordad, Z.D. Goodman, H.L. Sings, N. Boparai, M. Burroughs, C.A. Brass, J.K. Albrecht, R. Esteban, HCV RESPOND-2 Investigators. 2011.** Boceprevir for previously treated chronic HCV genotype 1 infection. *New England Journal of Medicine*. **364**:1207-1217.

**Baldick, C.J., M.J. Wichroski, A. Pendri, A.W. Walsh, J. Fang, C.E. Mazzucco, K.A. Pokornowski, R.E. Rose, B.J. Eggers, M. Hsu, W. Zhai, G. Zhai, S.W. Gerritz, M.A. Poss, N.A. Meanwell, M.I. Cockett, and D.J. Tenney. 2010.** A novel small molecule inhibitor of hepatitis C virus entry. *PLoS Pathogens*. **6**:e1001086.

**Barba, G., F. Harper, T. Harada, M. Kohara, S. Goulinet, Y. Matsuura, G. Eder, Z. Schaff, M.J. Chapman, T. Miyamura, and C. Bréchet. 1997.** Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **94**:1200-1205.

- Barnes, E., A. Folgori, S. Capone, L. Swadling, S. Aston, A. Kurioka, J. Meyer, R. Huddart, K. Smith, R. Townsend, A. Brown, R. Antrobus, V. Ammendola, M. Naddeo, G. O'Hara, C. Willberg, A. Harrison, F. Grazioli, M.L. Esposito, L. Siani, C. Traboni, Y. Oo, D. Adams, A. Hill, S. Colloca, A. Nicosia, R. Cortese, and P. Klenerman. 2012.** Novel adenovirus-based vaccines induce broad and sustained T cell responses to HCV in man. *Science Translational Medicine*. **4**:115ra1.
- Barrera, J.M., M. Bruguera, M. Guadalupe Ercilla, C. Gil, R. Celis, M.P. Gil, M. del Valle Onorato, J. Rodes, and A. Ordinas. 1995.** Persistent hepatitis C viremia after acute self-limiting posttransfusion hepatitis C. *Hepatology*. **21**:639-644.
- Bartenschlager, R., V. Lohmann, T. Wilkinson, and J.O. Koch. 1995.** Complex formation between the NS3 serine-type proteinase of the hepatitis C virus and NS4A and its importance for polyprotein maturation. *Journal of Virology*. **69**:7519-7528.
- Bartenschlager, R., A. Kaul, and S. Sparacio. 2003.** Replication of the hepatitis C virus in cell culture. *Antiviral Research*. **60**:91-102.
- Barth, H., C. Schafer, M.I. Adah, F. Zhang, R.J. Linhardt, H. Toyoda, A. Kinoshita-Toyoda, T. Toida, T.H. Van Kuppevelt, E. Depla, F. Von Weizsacker, H.E. Blum, and T.F. Baumert. 2003.** Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate. *Journal of Biological Chemistry*. **278**:41003-41012.
- Barth, H., R. Cerino, M. Arcuri, M. Hoffmann, P. Schürmann, M.I. Adah, B. Gissler, X. Zhao, V. Ghisetti, B. Lavezzo, H.E. Blum, F. Von Weizsacker, A. Vitelli, E. Scarselli, and T.F. Baumert. 2005.** Scavenger receptor class B type I and hepatitis C virus infection of primary tupaia hepatocytes. *Journal of Virology*. **79**:5774-5785.
- Barth, H., E.K. Schnober, F. Zhang, R.J. Linhardt, E. Depla, B. Boson, F.L. Cosset, A.H. Patel, H.E. Blum, and T.F. Baumert. 2006.** Viral and cellular determinants of the hepatitis C virus envelope-heparan sulfate interaction. *Journal of Virology*. **80**:10579-10590.
- Barth, H. 2011.** Insights into the role of interferon lambda in hepatitis C virus infection. *Journal of Hepatology*. **54**:844-847.
- Bartosch, B., A. Vitelli, C. Granier, C. Goujon, J. Dubuisson, S. Pascale, E. Scarselli, R. Cortese, A. Nicosia, and F.L. Cosset. 2003a.** Cell entry of hepatitis C virus requires a set of co-receptors that include the CD81 tetraspanin and the SR-BI scavenger receptor. *Journal of Biological Chemistry*. **278**:41624-41630.
- Bartosch, B., J. Bukh, J.C. Meunier, C. Granier, R.E. Engle, W.C. Blackwelder, S.U. Emerson, F.L. Cosset, and R.H. Purcell. 2003b.** *In vitro* assay for neutralizing antibody to hepatitis C virus: evidence for broadly conserved neutralization epitopes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **100**:14199-14204.
- Bartosch, B., J. Dubuisson, and F.L. Cosset. 2003c.** Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *Journal of Experimental Medicine*. **197**:633-642.

- Bartosch, B., G. Verney, M. Dreux, P. Donot, Y. Morice, F. Penin, J.M. Pawlotsky, D. Lavillette, and F.L. Cosset. 2005.** An interplay between hypervariable region 1 of the hepatitis C virus E2 glycoprotein, the scavenger receptor BI, and high-density lipoprotein promotes both enhancement of infection and protection against neutralizing antibodies. *Journal of Virology*. **79**:8217-8229.
- Bassett, S.E., K.M. Brasky, and R.E. Lanford. 1998.** Analysis of hepatitis C virus-inoculated chimpanzees reveals unexpected clinical profiles. *Journal of Virology*. **72**:2589-2599.
- Basu, A., T. Kanda, A. Beyene, K. Saito, K. Meyer, and R. Ray. 2007.** Sulfated homologues of heparin inhibit hepatitis C virus entry into mammalian cells. *Journal of Virology*. **81**:3933-3941.
- Baumert, T.F., S. Ito, D.T. Wong, and T.J. Liang. 1998.** Hepatitis C virus structural proteins assemble into virus-like particles in insect cells. *Journal of Virology*. **72**:3827-3836.
- Baumert, T.F., S. Wellnitz, S. Aono, J. Satoi, D. Herion, J. Tilman Gerlach, G.R. Pape, J.Y. Lau, J.H. Hoofnagle, H.E. Blum, and T.J. Liang. 2000.** Antibodies against hepatitis C virus-like particles and viral clearance in acute and chronic hepatitis C. *Hepatology*. **32**:610-617.
- Behrens, S.E., L. Tomei, and R. De Francesco. 1996.** Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *EMBO Journal*. **15**:12-22.
- Benga, W.J.A., S.E. Krieger, M. Dimitrova, M.B. Zeisel, M. Parnot, J. Lupberger, E. Hildt, G. Luo, J. McLauchlan, T.F. Baumert, and C. Schuster. 2010.** Apolipoprotein E interacts with hepatitis C virus nonstructural protein 5A and determines assembly of infectious particles. *Hepatology*. **51**:43-53.
- Berger, K.L., J.D. Cooper, N.S. Heaton, R. Yoon, T.E. Oakland, T.X. Jordan, G. Mateu, A. Grakoui, and G. Randall. 2009.** Roles for endocytic trafficking and phosphatidylinositol 4-kinase III alpha in hepatitis C virus replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **106**:7577-7582.
- Bhattacharya, D., M.A. Accola, I.H. Ansari, R. Striker, and W.M. Rehrauer. 2011.** Naturally occurring genotype 2b/1a hepatitis C virus in the United States. *Virology Journal*. **8**:458.
- Bianco, A., V. Reghellin, L. Donnici, S. Fenu, and R. Alvarez. 2012.** Metabolism of phosphatidylinositol 4-kinase III $\alpha$ -dependent PI4P is subverted by HCV and is targeted by a 4-anilino quinazoline with antiviral activity. *PLoS Pathogens*. **8**:e1002576.
- Bigger, C.B., K.M. Brasky, and R.E. Lanford. 2001.** DNA microarray analysis of chimpanzee liver during acute resolving hepatitis C virus infection. *Journal of Virology*. **75**:7059-7066.
- Bihl, F., and F. Negro. 2009.** Chronic hepatitis E in the immunosuppressed: a new source of trouble? *Journal of Hepatology*. **50**:435-437.

- Biswal, B.K., M.M. Cherney, M. Wang, L. Chan, C.G. Yannopoulos, D. Bilimoria, O. Nicolas, J. Bedard, and M.N.G. James. 2005.** Crystal structures of the RNA-dependent RNA polymerase genotype 2a of hepatitis C virus reveal two conformations and suggest mechanisms of inhibition by non-nucleoside inhibitors. *Journal of Biological Chemistry*. **280**:18202-18210.
- Biswal, B.K., M. Wang, M.M. Cherney, L. Chan, C.G. Yannopoulos, D. Bilimoria, J. Bedard, and M.N.G. James. 2006.** Non-nucleoside inhibitors binding to hepatitis C virus NS5B polymerase reveal a novel mechanism of inhibition. *Journal of Molecular Biology*. **361**:33-45.
- Blanchard, E., S. Belouzard, L. Goueslain, T. Wakita, J. Dubuisson, C. Wychowski, and Y. Rouillé. 2006.** Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *Journal of Virology*. **80**:6964-6972.
- Blight, K.J., A.A. Kolykhalov, and C.M. Rice. 2000.** Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science*. **290**:1972-1974.
- Blight, K.J., J.A. McKeating, and C.M. Rice. 2002.** Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication. *Journal of Virology*. **76**:13001-13014.
- Bode, J.G., S. Ludwig, C. Ehrhardt, U. Albrecht, A. Erhardt, F. Schaper, P.C. Heinrich, and D. Häussinger. 2003.** IFN-alpha antagonistic activity of HCV core protein involves induction of suppressor of cytokine signaling-3. *FASEB Journal*. **17**:488-490.
- Bodenheimer, H.C., K.L. Lindsay, G.L. Davis, J.H. Lewis, S.N. Thung, and L.B. Seeff. 1997.** Tolerance and efficacy of oral ribavirin treatment of chronic hepatitis C: a multicenter trial. *Hepatology*. **26**:473-477.
- Borawski, J., P. Troke, X. Puyang, V. Gibaja, S. Zhao, C. Mickanin, J. Leighton-Davies, C.J. Wilson, V. Myer, I. Cornellataracido, J. Baryza, J. Tallarico, G. Joberty, M. Bantscheff, M. Schirle, T. Bouwmeester, J.E. Mathy, K. Lin, T. Compton, M. Labow, B. Wiedmann, and L.A. Gaither. 2009.** Class III phosphatidylinositol 4-kinase alpha and beta are novel host factor regulators of hepatitis C virus replication. *Journal of Virology*. **83**:10058-10074.
- Boson, B., O. Granio, R. Bartenschlager, and F.L. Cosset. 2011.** A concerted action of hepatitis C virus p7 and nonstructural protein 2 regulates core localization at the endoplasmic reticulum and virus assembly. *PLoS Pathogens*. **7**:e1002144.
- Boucheix, C., and E. Rubinstein. 2001.** Tetraspanins. *Cellular and Molecular Life Sciences*. **58**:1189-1205.
- Boulant, S., C. Vanbelle, C. Ebel, F. Penin, and J.P. Lavergne. 2005.** Hepatitis C virus core protein is a dimeric alpha-helical protein exhibiting membrane protein features. *Journal of Virology*. **79**:11353-11365.
- Boulant, S., R. Montserret, R.G. Hope, M. Ratniner, P. Targett-Adams, J.P. Lavergne, F. Penin, and J. McLauchlan. 2006.** Structural determinants that target the hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *Journal of Biological Chemistry*. **281**:22236-22247.

- Boulant, S., P. Targett-Adams, and J. McLauchlan. 2007.** Disrupting the association of hepatitis C virus core protein with lipid droplets correlates with a loss in production of infectious virus. *Journal of General Virology*. **88**:2204-2213.
- Bowen, D.G., and C.M. Walker. 2005.** Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection. *Nature*. **436**:946-952.
- Bradley, D.W., J.E. Maynard, H. Popper, E.H. Cook, J.W. Ebert, K.A. McCaustland, C.A. Schable, and H.A. Fields. 1983.** Posttransfusion non-A, non-B hepatitis: physicochemical properties of two distinct agents. *Journal of Infectious Diseases*. **148**:254-265.
- Bradley, D.W., K.A. McCaustland, E.H. Cook, C.A. Schable, J.W. Ebert and J.E. Maynard. 1985.** Posttransfusion non-A, non-B hepatitis in chimpanzees. Physicochemical evidence that the tubule-forming agent is a small, enveloped virus. *Gastroenterology*. **88**:773-779.
- Branch, A.D., D.D. Stump, J.A. Gutierrez, F. Eng, and J.L. Walewski. 2005.** The hepatitis C virus alternate reading frame (ARF) and its family of novel products: the alternate reading frame protein/F-protein, the double-frameshift protein, and others. *Seminars in Liver Disease*. **25**:105-117.
- Brass, V., E. Bieck, R. Montserret, B. Wölk, J.A. Hellings, H.E. Blum, F. Penin, and D. Moradpour. 2002.** An amino-terminal amphipathic alpha-helix mediates membrane association of the hepatitis C virus nonstructural protein 5A. *Journal of Biological Chemistry*. **277**:8130-8139.
- Brazzoli, M., A. Bianchi, S. Filippini, A. Weiner, Q. Zhu, M. Pizza, and S. Crotta. 2008.** CD81 is a central regulator of cellular events required for hepatitis C virus infection of human hepatocytes. *Journal of Virology*. **82**:8316-8329.
- Bressanelli, S., L. Tomei, A. Roussel, I. Incitti, R.L. Vitale, M. Mathieu, R. De Francesco, and F.A. Rey. 1999.** Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **96**:13034-13039.
- Bressanelli, S., L. Tomei, F.A. Rey, and R. De Francesco. 2002.** Structural analysis of the hepatitis C virus RNA polymerase in complex with ribonucleotides. *Journal of Virology*. **76**:3482-3492.
- Brown, R.S. 2005.** Hepatitis C and liver transplantation. *Nature*. **436**:973-978.
- Bruneton, J. 1999.** Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants: phytochemistry, medicinal plants. Intercept Ltd.
- Bukh, J. 2004.** A critical role for the chimpanzee model in the study of hepatitis C. *Hepatology*. **39**:1469-1475.
- Buonocore, L., K.J. Blight, C.M. Rice, and J.K. Rose. 2002.** Characterization of vesicular stomatitis virus recombinants that express and incorporate high levels of hepatitis C virus glycoproteins. *Journal of Virology*. **76**:6865-6872.

**Burbelo, P.D., E.J. Dubovi, P. Simmonds, J.L. Medina, J.A. Henriquez, N. Mishra, J. Wagner, R. Tokarz, J.M. Cullen, M.J. Iadarola, C.M. Rice, W.I. Lipkin, and A. Kapoor. 2012.** Serology-enabled discovery of genetically diverse hepaciviruses in a new host. *Journal of Virology*. **86**:6171-6178.

## C

**Caetano, J., A. Martinho, A. Paiva, B. Pais, C. Valente, and C. Luxo. 2008.** Differences in hepatitis C virus (HCV)-specific CD8 T-cell phenotype during pegylated alpha interferon and ribavirin treatment are related to response to antiviral therapy in patients chronically infected with HCV. *Journal of Virology*. **82**:7567-7577.

**Cai, Z., L. Cai, J. Jiang, K.S. Chang, D.R. van der Westhuyzen, and G. Luo. 2007.** Human serum amyloid A protein inhibits hepatitis C virus entry into cells. *Journal of Virology*. **81**:6128-6133.

**Calland, N., A. Albecka, S. Belouzard, C. Wychowski, G. Duverlie, V. Descamps, D. Hober, J. Dubuisson, Y. Rouillé, and K. Séron. 2012.** (-)-Epigallocatechin-3-gallate is a new inhibitor of hepatitis C virus entry. *Hepatology*. **55**:720-729.

**Callens, N., Y. Ciczora, B. Bartosch, N. Vu-Dac, F.L. Cosset, J.M. Pawlotsky, F. Penin, and J. Dubuisson. 2005.** Basic residues in hypervariable region 1 of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 contribute to virus entry. *Journal of Virology*. **79**:15331-15341.

**Cao, G., E. Sofic, and L. Ronald. 1996.** Antioxidant capacity of tea and common vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **44**:3426-3431.

**Carcamo, W.C., and C.Q. Nguyen. 2012.** Advancement in the development of models for hepatitis C research. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. **2012**:346761.

**Carrère-Kremer, S., C. Montpellier-Pala, L. Cocquerel, C. Wychowski, F. Penin, and J. Dubuisson. 2002.** Subcellular localization and topology of the p7 polypeptide of hepatitis C virus. *Journal of Virology*. **76**:3720-3730.

**Castet, V., C. Fournier, A. Soulier, R. Brillet, J. Coste, D. Larrey, D. Dhumeaux, P. Maurel, and J.M. Pawlotsky. 2002.** Alpha interferon inhibits hepatitis C virus replication in primary human hepatocytes infected *in vitro*. *Journal of Virology*. **76**:8189-8199.

**Catanese, M.T., R. Graziani, T. von Hahn, M. Moreau, T. Huby, G. Paonessa, C. Santini, A. Luzzago, C.M. Rice, R. Cortese, A. Vitelli, and A. Nicosia. 2007.** High-avidity monoclonal antibodies against the human scavenger class B type I receptor efficiently block hepatitis C virus infection in the presence of high-density lipoprotein. *Journal of Virology*. **81**:8063-8071.

**Chang, K.S., J. Jiang, Z. Cai, and G. Luo. 2007.** Human apolipoprotein E is required for infectivity and production of hepatitis C virus in cell culture. *Journal of Virology*. **81**:13783-13793.

- Chang, T.Y., and C. Chang. 2008.** Ezetimibe blocks internalization of the NPC1L1/cholesterol complex. *Cell Metabolism*. **7**:469-471.
- Charlton, M., and M.D. Leise. 2011.** Boceprevir (Victrelis) for HCV: V is for victory and very complex. *Hepatology*. **54**:1882-1886.
- Charlton, M.R., A. Thompson, B.J. Veldt, K. Watt, H. Tillmann, J.J. Poterucha, J.K. Heimbach, D. Goldstein, and J. McHutchison. 2011.** Interleukin-28B polymorphisms are associated with histological recurrence and treatment response following liver transplantation in patients with hepatitis C virus infection. *Hepatology*. **53**:317-324.
- Charrin, S., F. Le Naour, V. Labas, M. Billard, J.P. Le Caer, J.F. Emile, M.A. Petit, C. Boucheix, and E. Rubinstein. 2003.** EWI-2 is a new component of the tetraspanin web in hepatocytes and lymphoid cells. *Biochemical Journal*. **373**:409-421.
- Chatterji, U., M. Bobardt, S. Selvarajah, F. Yang, H. Tang, N. Sakamoto, G. Vuagniaux, T. Parkinson, and P. Gallay. 2009.** The isomerase active site of cyclophilin A is critical for hepatitis C virus replication. *Journal of Biological Chemistry*. **284**:16998-17005.
- Chatterji, U., M.D. Bobardt, P. Lim, and P.A. Gallay. 2010.** Cyclophilin A-independent recruitment of NS5A and NS5B into hepatitis C virus replication complexes. *Journal of General Virology*. **91**:1189-1193.
- Cheent, K., and S.I. Khakoo. 2011.** Natural killer cells and hepatitis C: action and reaction. *Gut*. **60**:268-278.
- Chemello, L., L. Cavalletto, E. Bernardinello, M. Guido, P. Pontisso, and A. Alberti. 1995.** The effect of interferon alfa and ribavirin combination therapy in naive patients with chronic hepatitis C. *Journal of Hepatology*. **23 (Suppl 2)**:8-12.
- Chen, C., H. Qiu, J. Gong, Q. Liu, H. Xiao, X.W. Chen, B.L. Sun, and R.G. Yang. 2012.** (-)-Epigallocatechin-3-gallate inhibits the replication cycle of hepatitis C virus. *Archives of Virology*. **157**:1301-1312.
- Chen, D., S.B. Wan, H. Yang, J. Yuan, T.H. Chan, and Q.P. Dou. 2011.** EGCG, green tea polyphenols and their synthetic analogs and prodrugs for human cancer prevention and treatment. *Advances in Clinical Chemistry*. **53**:155-177.
- Chevaliez, S., and J.M. Pawlotsky. 2006.** Hepatitis C virus serologic and virologic tests and clinical diagnosis of HCV-related liver disease. *International Journal of Medical Sciences*. **3**:35-40.
- Chevaliez, S., and J.M. Pawlotsky. 2007.** Hepatitis C virus: virology, diagnosis and management of antiviral therapy. *World Journal of Gastroenterology*. **13**:2461.
- Chevaliez, S., and J.M. Pawlotsky. 2009.** How to use virological tools for optimal management of chronic hepatitis C. *Liver International*. **29 (Suppl 1)**:9-14.
- Cho, E.J., S. Xia, L.C. Ma, J. Robertus, R.M. Krug, E.V. Anslyn, G.T. Montelione, and A.D. Ellington. 2012.** Identification of influenza virus inhibitors targeting NS1A utilizing fluorescence polarization-based high-throughput assay. *Journal of Biomolecular Screening*. **17**:448-459.

- Choo, Q.L., G. Kuo, A.J. Weiner, L.R. Overby, D.W. Bradley, and M. Houghton. 1989.** Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*. **244**:359-362.
- Choo, Q.L., K.H. Richman, J.H. Han, K. Berger, C. Lee, C. Dong, C. Gallegos, D. Coit, R. Medina-Selby, and P.J. Barr. 1991.** Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **88**:2451-2455.
- Choo, Q.L., G. Kuo, R. Ralston, A. Weiner, D. Chien, G. Van Nest, J. Han, K. Berger, K. Thudium, and C. Kuo. 1994.** Vaccination of chimpanzees against infection by the hepatitis C virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **91**:1294-1298.
- Choo, S.H., H.S. So, J.M. Cho, and W.S. Ryu. 1995.** Association of hepatitis C virus particles with immunoglobulin: a mechanism for persistent infection. *Journal of General Virology*. **76**:2337-2341.
- Chow, H.H.S., Y. Cai, I.A. Hakim, J.A. Crowell, F. Shahi, C.A. Brooks, R.T. Dorr, Y. Hara, and D.S. Alberts. 2003.** Pharmacokinetics and safety of green tea polyphenols after multiple-dose administration of epigallocatechin gallate and polyphenon E in healthy individuals. *Clinical Cancer Research*. **9**:3312-3319.
- Ciczora, Y., N. Callens, F. Penin, E.I. Pécheur, and J. Dubuisson. 2007.** Transmembrane domains of hepatitis C virus envelope glycoproteins: residues involved in E1E2 heterodimerization and involvement of these domains in virus entry. *Journal of Virology*. **81**:2372-2381.
- Ciesek, S., E. Steinmann, H. Wedemeyer, M.P. Manns, J. Neyts, N. Tautz, V. Madan, R. Bartenschlager, T. von Hahn, and T. Pietschmann. 2009.** Cyclosporine A inhibits hepatitis C virus nonstructural protein 2 through cyclophilin A. *Hepatology*. **50**:1638-1645.
- Ciesek, S., T. von Hahn, C.C. Colpitts, L.M. Schang, M. Friesland, J. Steinmann, M.P. Manns, M. Ott, H. Wedemeyer, P. Meuleman, T. Pietschmann, and E. Steinmann. 2011.** The green tea polyphenol, epigallocatechin-3-gallate, inhibits hepatitis C virus entry. *Hepatology*. **54**:1947-1955.
- Clément, H., Y. Le Conte, J.-M. Barbançon, and B. Vaissière. 2011.** Le traité rustica de l'apiculture.
- Cocquerel, L., J.C. Meunier, A. Pillez, C. Wychowski, and J. Dubuisson. 1998.** A retention signal necessary and sufficient for endoplasmic reticulum localization maps to the transmembrane domain of hepatitis C virus glycoprotein E2. *Journal of Virology*. **72**:2183-2191.
- Cocquerel, L., S. Duvet, J.C. Meunier, A. Pillez, R. Cacan, C. Wychowski, and J. Dubuisson. 1999.** The transmembrane domain of hepatitis C virus glycoprotein E1 is a signal for static retention in the endoplasmic reticulum. *Journal of Virology*. **73**:2641-2649.
- Cocquerel, L., C. Wychowski, F. Minner, F. Penin, and J. Dubuisson. 2000.** Charged residues in the transmembrane domains of hepatitis C virus glycoproteins play a major role in the processing, subcellular localization, and assembly of these envelope proteins. *Journal of Virology*. **74**:3623-3633.

**Cocquerel, L., C.C. Kuo, J. Dubuisson, and S. Levy. 2003.** CD81-dependent binding of hepatitis C virus E1E2 heterodimers. *Journal of Virology*. **77**:10677-10683.

**Cook, N.C., and S. Samman. 1996.** Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Journal of Nutritional Biochemistry*. **7**:66-76.

**Cooper, S., A.L. Erickson, E.J. Adams, J. Kansopon, A.J. Weiner, D.Y. Chien, M. Houghton, P. Parham, and C.M. Walker. 1999.** Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus. *Immunity*. **10**:439-449.

**Cormier, E.G., F. Tsamis, F. Kajumo, R.J. Durso, J.P. Gardner, and T. Dragic. 2004a.** CD81 is an entry coreceptor for hepatitis C virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **101**:7270-7274.

**Cormier, E.G., R.J. Durso, F. Tsamis, L. Boussebart, C. Manix, W.C. Olson, J.P. Gardner, and T. Dragic. 2004b.** L-SIGN (CD209L) and DC-SIGN (CD209) mediate transinfection of liver cells by hepatitis C virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **101**:14067-14072.

**Coughtrie, M.W., and L.E. Johnston. 2001.** Interactions between dietary chemicals and human sulfotransferases-molecular mechanisms and clinical significance. **29**:522-528.

**Cribier, B., C. Schmitt, A. Bingen, A. Kirn, and F. Keller. 1995.** *In vitro* infection of peripheral blood mononuclear cells by hepatitis C virus. *Journal of General Virology*. **76**:2485-2491.

**Crotty, S., D. Maag, J.J. Arnold, W. Zhong, J.Y. Lau, Z. Hong, R. Andino, and C.E. Cameron. 2000.** The broad-spectrum antiviral ribonucleoside ribavirin is an RNA virus mutagen. *Nature Medicine*. **6**:1375-1379.

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

## D

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

**Davies, J.P., C. Scott, K. Oishi, A. Liapis, and Y.A. Ioannou. 2005.** Inactivation of NPC1L1 causes multiple lipid transport defects and protects against diet-induced hypercholesterolemia. *Journal of Biological Chemistry*. **280**:12710-12720.

**Davis, G.L., J.B. Wong, J.G. McHutchison, M.P. Manns, J. Harvey, and J. Albrecht. 2003.** Early virologic response to treatment with peginterferon alfa-2b plus ribavirin in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*. **38**:645-652.

**Davis, G.L., and K.L. Lindsay. 2005.** Treatment of chronic hepatitis C infection: one step at a time. *Lancet Infectious Diseases*. **5**:524-526.

- Davis, H.R., L.J. Zhu, L.M. Hoos, G. Tetzloff, M. Maguire, J. Liu, X. Yao, S.P.N. Iyer, M.H. Lam, E.G. Lund, P.A. Detmers, M.P. Graziano, and S.W. Altmann. 2004.** Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) is the intestinal phytosterol and cholesterol transporter and a key modulator of whole-body cholesterol homeostasis. *Journal of Biological Chemistry*. **279**:33586-33592.
- de Niet, A., H.L. Zaaijer, I. Ten Berge, C.J. Weegink, H.W. Reesink, and U. Beuers. 2012.** Chronic hepatitis E after solid organ transplantation. *Netherlands Journal of Medicine*. **70**:261-266.
- Deleersnyder, V., A. Pillez, C. Wychowski, K. Blight, J. Xu, Y.S. Hahn, C.M. Rice, and J. Dubuisson. 1997.** Formation of native hepatitis C virus glycoprotein complexes. *Journal of Virology*. **71**:697-704.
- Delgrange, D., A. Pillez, S. Castelain, L. Cocquerel, Y. Rouillé, J. Dubuisson, T. Wakita, G. Duverlie, and C. Wychowski. 2007.** Robust production of infectious viral particles in Huh-7 cells by introducing mutations in hepatitis C virus structural proteins. *Journal of General Virology*. **88**:2495-2503.
- Dentzer, T.G., I.C. Lorenz, M.J. Evans, and C.M. Rice. 2009.** Determinants of the hepatitis C virus nonstructural protein 2 protease domain required for production of infectious virus. *Journal of Virology*. **83**:12702-12713.
- Di Bisceglie, A.M., and J.H. Hoofnagle. 2002.** Optimal therapy of hepatitis C. *Hepatology*. **36 (Suppl 5B)**:121-127.
- Di Carlo, G., N. Mascolo, A.A. Izzo, and F. Capasso. 1999.** Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sciences*. **65**:337-353.
- Diao, J., H. Pantua, H. Ngu, L. Komuves, L. Diehl, G. Schaefer, and S.B. Kapadia. 2012.** Hepatitis C Virus Induces Epidermal Growth Factor Receptor Activation via CD81 Binding for Viral Internalization and Entry. *Journal of Virology*. **86**:10935-10949.
- Dorner, M., J.A. Horwitz, J.B. Robbins, W.T. Barry, Q. Feng, K. Mu, C.T. Jones, J.W. Schoggins, M.T. Catanese, D.R. Burton, M. Law, C.M. Rice, and A. Ploss. 2011.** A genetically humanized mouse model for hepatitis C virus infection. *Nature*. **474**:208-211.
- Dorner, M., C.M. Rice, and A. Ploss. 2012.** Study of hepatitis C virus entry in genetically humanized mice. *Methods*. Epub ahead of print.
- Dreux, M., V.L. Dao Thi, J. Fresquet, M. Guerin, Z. Julia, G. Verney, D. Durantel, F. Zoulim, D. Lavillette, F.L. Cosset, and B. Bartosch. 2009.** Receptor complementation and mutagenesis reveal SR-BI as an essential HCV entry factor and functionally imply its intra- and extra-cellular domains. *PLoS Pathogens*. **5**:e1000310.
- Drummer, H.E., A. Maerz, and P. Pountourios. 2003.** Cell surface expression of functional hepatitis C virus E1 and E2 glycoproteins. *FEBS Letters*. **546**:385-390.
- Dubois, F., J.C. Desenclos, N. Mariotte, and A. Goudeau. 1997.** Hepatitis C in a French population-based survey, 1994: seroprevalence, frequency of viremia, genotype distribution, and risk factors. The Collaborative Study Group. *Hepatology*. **25**:1490-1496.

**Dubuisson, J., H.H. Hsu, R.C. Cheung, H.B. Greenberg, D.G. Russell, and C.M. Rice. 1994.** Formation and intracellular localization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia and Sindbis viruses. *Journal of Virology*. **68**:6147-6160.

**Dubuisson, J., F. Penin, and D. Moradpour. 2002.** Interaction of hepatitis C virus proteins with host cell membranes and lipids. *Trends in Cell Biology*. **12**:517-523.

**Dusheiko, G., J. Main, H. Thomas, O. Reichard, C. Lee, A. Dhillon, S. Rassam, A. Fryden, H. Reesink, M. Bassendine, G. Norkrans, T. Cuypers, N. Lelie, P. Telfer, J. Watson, C. Weegink, P. Sillikens, and O. Weiland. 1996.** Ribavirin treatment for patients with chronic hepatitis C: results of a placebo-controlled study. *Journal of Hepatology*. **25**:591-598.

## **E**

**Egger, D., B. Wolk, R. Gosert, L. Bianchi, H.E. Blum, D. Moradpour, and K. Bienz. 2002.** Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *Journal of Virology*. **76**:5974-5984.

**Einav, S., M. Elazar, T. Danieli, and J.S. Glenn. 2004.** A nucleotide binding motif in hepatitis C virus (HCV) NS4B mediates HCV RNA replication. *Journal of Virology*. **78**:11288-11295.

**Elazar, M., K.H. Cheong, P. Liu, H.B. Greenberg, C.M. Rice, and J.S. Glenn. 2003.** Amphipathic helix-dependent localization of NS5A mediates hepatitis C virus RNA replication. *Journal of Virology*. **77**:6055-6061.

**Elmowalid, G.A., M. Qiao, S.H. Jeong, B.B. Borg, T.F. Baumert, R.K. Sapp, Z. Hu, K. Murthy, and T.J. Liang. 2007.** Immunization with hepatitis C virus-like particles results in control of hepatitis C virus infection in chimpanzees. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **104**:8427-8432.

**Erdtmann, L., N. Franck, H. Lerat, J. Le Seyec, D. Gilot, I. Cannie, P. Gripon, U. Hibner, and C. Guguen-Guillouzo. 2003.** The hepatitis C virus NS2 protein is an inhibitor of CIDE-B-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*. **278**:18256-18264.

**Evans, M.J., C.M. Rice, and S.P. Goff. 2004.** Phosphorylation of hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates its protein interactions and viral RNA replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **101**:13038-13043.

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

## **F**

**Failla, C., L. Tomei, and R. De Francesco. 1994.** Both NS3 and NS4A are required for proteolytic processing of hepatitis C virus nonstructural proteins. *Journal of Virology*. **68**:3753-3760.

- Farci, P., H.J. Alter, S. Govindarajan, D.C. Wong, R. Engle, R.R. Lesniewski, I.K. Mushahwar, S.M. Desai, R.H. Miller, and N. Ogata. 1992.** Lack of protective immunity against reinfection with hepatitis C virus. *Science*. **258**:135-140.
- Farci, P., H.J. Alter, D.C. Wong, R.H. Miller, S. Govindarajan, R. Engle, M. Shapiro, and R.H. Purcell. 1994.** Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees after antibody-mediated *in vitro* neutralization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **91**:7792-7796.
- Farci, P., A. Shimoda, D. Wong, T. Cabezon, D. De Gioannis, A. Strazzer, Y. Shimizu, M. Shapiro, H.J. Alter, and R.H. Purcell. 1996a.** Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees by hyperimmune serum against the hypervariable region 1 of the envelope E2 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **93**:15394-15399.
- Farci, P., H.J. Alter, A. Shimoda, S. Govindarajan, L.C. Cheung, J.C. Melpolder, R.A. Sacher, J.W. Shih, and R.H. Purcell. 1996b.** Hepatitis C virus-associated fulminant hepatic failure. *New England Journal of Medicine*. **335**:631-634.
- Farci, P., A. Shimoda, A. Coiana, G. Diaz, G. Peddis, J.C. Melpolder, A. Strazzer, D.Y. Chien, S.J. Munoz, and A. Balestrieri. 2000.** The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. *Science*. **288**:339-344.
- Fassina, G., A. Buffa, R. Benelli, O.E. Varnier, D.M. Noonan, and A. Albini. 2002.** Polyphenolic antioxidant (-)-epigallocatechin-3-gallate from green tea as a candidate anti-HIV agent. *AIDS*. **16**:939-941.
- Feinstone, S.M., A.Z. Kapikian, R.H. Purcell, H.J. Alter, and P.V. Holland. 1975.** Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *New England Journal of Medicine*. **292**:767-770.
- Feinstone, S.M., K.B. Mihalik, T. Kamimura, H.J. Alter, W.T. London, and R.H. Purcell. 1983.** Inactivation of hepatitis B virus and non-A, non-B hepatitis by chloroform. *Infection and Immunity*. **41**:816-821.
- Feld, J.J., and J.H. Hoofnagle. 2005.** Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. *Nature*. **436**:967-972.
- Féray, C., M. Gigou, D. Samuel, B. Ducot, P. Maisonneuve, M. Reynès, A. Bismuth, and H. Bismuth. 1998.** Incidence of hepatitis C in patients receiving different preparations of hepatitis B immunoglobulins after liver transplantation. *Annals of Internal Medicine*. **128**:810-816.
- Fiorucci, M., S. Boulant, A. Fournillier, J.D. Abraham, J.P. Lavergne, G. Paranhos-Baccala, G. Inchauspé, and C. Bain. 2007.** Expression of the alternative reading frame protein of Hepatitis C virus induces cytokines involved in hepatic injuries. *Journal of General Virology*. **88**:1149-1162.
- Firbas, C., B. Jilma, E. Tauber, V. Buerger, S. Jelovcan, K. Lingnau, M. Buschle, J. Frisch, and C.S. Klade. 2006.** Immunogenicity and safety of a novel therapeutic hepatitis C virus (HCV) peptide vaccine: a randomized, placebo controlled trial for dose optimization in 128 healthy subjects. *Vaccine*. **24**:4343-4353.

- Fischer, R., T. Baumert, and H.E. Blum. 2007.** Hepatitis C virus infection and apoptosis. *World Journal of Gastroenterology*. **13**:4865-4872.
- Flint, M., C. Logvinoff, C.M. Rice, and J.A. McKeating. 2004.** Characterization of infectious retroviral pseudotype particles bearing hepatitis C virus glycoproteins. *Journal of Virology*. **78**:6875-6882.
- Flisiak, R., S.V. Feinman, M. Jablkowski, A. Horban, W. Kryczka, W. Halota, J.E. Heathcote, G. Mazzella, C. Vandelli, J.S. Liz, R. Crabbé, P. Scalfaro, and H. Porchet. 2008.** Efficacy and safety of increasing doses of the cyclophilin inhibitor Debio 025 in combination with pegylated interferon alpha-2a in treatment naive chronic HCV patients. *Journal of Hepatology*. **48 (Suppl 2)**:62.
- Flisiak, R., S.V. Feinman, M. Jablkowski, A. Horban, W. Kryczka, M. Pawlowska, J.E. Heathcote, G. Mazzella, C. Vandelli, V. Nicolas-Métral, P. Groscurin, J.S. Liz, P. Scalfaro, H. Porchet, and R. Crabbé. 2009.** The cyclophilin inhibitor Debio 025 combined with PEG IFNalpha2a significantly reduces viral load in treatment-naïve hepatitis C patients. *Hepatology*. **49**:1460-1468.
- Fofana, I., S.E. Krieger, F. Grunert, S. Glauben, F. Xiao, S. Fafi-Kremer, E. Soulier, C. Royer, C. Thumann, C.J. Mee, J.A. McKeating, T. Dragic, P. Pessaux, F. Stoll-Keller, C. Schuster, J. Thompson, and T.F. Baumert. 2010.** Monoclonal anti-claudin 1 antibodies prevent hepatitis C virus infection of primary human hepatocytes. *Gastroenterology*. **139**:953-964.
- Folgori, A., S. Capone, L. Ruggeri, A. Meola, E. Sporeno, B.B. Ercole, M. Pezzanera, R. Tafi, M. Arcuri, E. Fattori, A. Lahm, A. Luzzago, A. Vitelli, S. Colloca, R. Cortese, and A. Nicosia. 2006.** A T-cell HCV vaccine eliciting effective immunity against heterologous virus challenge in chimpanzees. *Nature Medicine*. **12**:190-197.
- Foster, G.R., C. Hézode, J.P. Bronowicki, G. Carosi, O. Weiland, L. Verlinden, R. van Heeswijk, B. van Baelen, G. Picchio, and M. Beumont. 2011.** Telaprevir alone or with peginterferon and ribavirin reduces HCV RNA in patients with chronic genotype 2 but not genotype 3 infections. *Gastroenterology*. **141**:881-889.
- Fournier, C., C. Sureau, J. Coste, J. Ducos, G. Pageaux, D. Larrey, J. Domergue, and P. Maurel. 1998.** *In vitro* infection of adult normal human hepatocytes in primary culture by hepatitis C virus. *Journal of General Virology*. **79**:2367-2374.
- Fraser, C.S., and J.A. Doudna. 2007.** Structural and mechanistic insights into hepatitis C viral translation initiation. *Nature Reviews Microbiology*. **5**:29-38.
- Freeman, A.J., G. Marinos, R.A. Ffrench, and A.R. Lloyd. 2005.** Intrahepatic and peripheral blood virus-specific cytotoxic T lymphocyte activity is associated with a response to combination IFN-alpha and ribavirin treatment among patients with chronic hepatitis C virus infection. *Journal of Viral Hepatitis*. **12**:125-129.
- Friebe, P., V. Lohmann, N. Krieger, and R. Bartenschlager. 2001.** Sequences in the 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication. *Journal of Virology*. **75**:12047-12057.

**Friebe, P., J. Boudet, J.P. Simorre, and R. Bartenschlager. 2005.** Kissing-loop interaction in the 3' end of the hepatitis C virus genome essential for RNA replication. *Journal of Virology*. **79**:380-392.

**Fried, M.W., M.L. Shiffman, K.R. Reddy, C. Smith, G. Marinos, F.L. Gonçales, D. Häussinger, M. Diago, G. Carosi, D. Dhumeaux, A. Craxi, A. Lin, J. Hoffman, and J. Yu. 2002.** Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *New England Journal of Medicine*. **347**:975-982.

**Furuta, T., Y. Hirooka, A. Abe, Y. Sugata, M. Ueda, K. Murakami, T. Suzuki, K. Tanaka, and T. Kan. 2007.** Concise synthesis of dideoxy-epigallocatechin gallate (DO-EGCG) and evaluation of its anti-influenza virus activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **17**:3095-3098.

## G

**Gal-Tanamy, M., W. Christopher, S. Foung, and S.M. Lemon. 2009.** Chapter 24 - Hepatitis C. Vaccines for Biodefense and Emerging and Neglected Diseases. 1st ed. A.D. Barrett and L.R. Stanberry, editors. pp 413-440.

**Gane, E.J., S.K. Roberts, C.A.M. Stedman, P.W. Angus, B. Ritchie, R. Elston, D. Ipe, P.N. Morcos, L. Baher, I. Najera, T. Chu, U. Lopatin, M.M. Berrey, W. Bradford, M. Laughlin, N.S. Shulman, and P.F. Smith. 2010.** Oral combination therapy with a nucleoside polymerase inhibitor (RG7128) and danoprevir for chronic hepatitis C genotype 1 infection (INFORM-1): a randomised, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation trial. *Lancet*. **376**:1467-1475.

**Gao, L., H. Aizaki, J.W. He, and M.M.C. Lai. 2004.** Interactions between viral nonstructural proteins and host protein hVAP-33 mediate the formation of hepatitis C virus RNA replication complex on lipid raft. *Journal of Virology*. **78**:3480-3488.

**Garber, K. 2011.** Hepatitis C: move over interferon. *Nature Biotechnology*. **29**:963-966.

**Gardner, J.P., R.J. Durso, R.R. Arrigale, G.P. Donovan, P.J. Maddon, T. Dragic, and W.C. Olson. 2003.** L-SIGN (CD 209L) is a liver-specific capture receptor for hepatitis C virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **100**:4498-4503.

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

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

**Gastaminza, P., K.A. Dryden, B. Boyd, M.R. Wood, M. Law, M. Yeager, and F.V. Chisari. 2010.** Ultrastructural and biophysical characterization of hepatitis C virus particles produced in cell culture. *Journal of Virology*. **84**:10999-11009.

- Ge, D., J. Fellay, A.J. Thompson, J.S. Simon, K.V. Shianna, T.J. Urban, E.L. Heinzen, P. Qiu, A.H. Bertelsen, A.J. Muir, M. Sulkowski, J.G. McHutchison, and D.B. Goldstein. 2009.** Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature*. **461**:399-401.
- Gerlach, J.T., H.M. Diepolder, M.C. Jung, N.H. Gruener, W.W. Schraut, R. Zachoval, R. Hoffmann, C.A. Schirren, T. Santantonio, and G.R. Pape. 1999.** Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus-specific CD4(+) T-cell response in acute hepatitis C. *Gastroenterology*. **117**:933-941.
- Germi, R., J.M. Crance, D. Garin, J. Guimet, H. Lortat-Jacob, R.W.H. Ruigrok, J.P. Zarski, and E. Drouet. 2002.** Cellular glycosaminoglycans and low density lipoprotein receptor are involved in hepatitis C virus adsorption. *Journal of Medical Virology*. **68**:206-215.
- Ghany, M.G., D.B. Strader, D.L. Thomas, L.B. Seeff, American Association for the Study of Liver Diseases. 2009.** Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. *Hepatology*. **49**:1335-1374.
- Giang, E., M. Dorner, J.C. Prentoe, M. Dreux, M.J. Evans, J. Bukh, C.M. Rice, A. Ploss, D.R. Burton, and M. Law. 2012.** Human broadly neutralizing antibodies to the envelope glycoprotein complex of hepatitis C virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **109**:6205-6210.
- Goffard, A., N. Callens, B. Bartosch, C. Wychowski, F.L. Cosset, C. Montpellier, and J. Dubuisson. 2005.** Role of N-linked glycans in the functions of hepatitis C virus envelope glycoproteins. *Journal of Virology*. **79**:8400-8409.
- Goldstein, J.L., M.S. Brown, R.G. Anderson, D.W. Russell, and W.J. Schneider. 1985.** Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system. *Annual Review of Cell Biology*. **1**:1-39.
- Gottwein, J.M., T.K.H. Scheel, T.B. Jensen, J.B. Lademann, J.C. Prentoe, M.L. Knudsen, A.M. Hoegh, and J. Bukh. 2009.** Development and characterization of hepatitis C virus genotype 1-7 cell culture systems: role of CD81 and scavenger receptor class B type I and effect of antiviral drugs. *Hepatology*. **49**:364-377.
- Goueslain, L., K. Alsaleh, P. Horellou, P. Roingeard, V. Descamps, G. Duverlie, Y. Ciczora, C. Wychowski, J. Dubuisson, and Y. Rouillé. 2010.** Identification of GBF1 as a cellular factor required for hepatitis C virus RNA replication. *Journal of Virology*. **84**:773-787.
- Gouttenoire, J., R. Montserret, A. Kennel, F. Penin, and D. Moradpour. 2009.** An amphipathic alpha-helix at the C terminus of hepatitis C virus nonstructural protein 4B mediates membrane association. *Journal of Virology*. **83**:11378-11384.
- Griffin, S., C. Stgelais, A.M. Owsianka, A.H. Patel, D. Rowlands, and M. Harris. 2008.** Genotype-dependent sensitivity of hepatitis C virus to inhibitors of the p7 ion channel. *Hepatology*. **48**:1779-1790.

**Griffin, S.D.C., R. Harvey, D.S. Clarke, W.S. Barclay, M. Harris, and D.J. Rowlands. 2004.** A conserved basic loop in hepatitis C virus p7 protein is required for amantadine-sensitive ion channel activity in mammalian cells but is dispensable for localization to mitochondria. *Journal of General Virology*. **85**:451-461.

**Grüner, N.H., T.J. Gerlach, M.C. Jung, H.M. Diepolder, C.A. Schirren, W.W. Schraut, R. Hoffmann, R. Zachoval, T. Santantonio, M. Cucchiari, A. Cerny, and G.R. Pape. 2000.** Association of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells with viral clearance in acute hepatitis C. *Journal of Infectious Diseases*. **181**:1528-1536.

## H

**Haberstroh, A., E.K. Schnober, M.B. Zeisel, P. Carolla, H. Barth, H.E. Blum, F.L. Cosset, G. Koutsoudakis, R. Bartenschlager, A. Union, E. Depla, A. Owsianka, A.H. Patel, C. Schuster, F. Stoll-Keller, M. Doffoël, M. Dreux, and T.F. Baumert. 2008.** Neutralizing host responses in hepatitis C virus infection target viral entry at postbinding steps and membrane fusion. *Gastroenterology*. **135**:1719-1728.

**Haid, S., T. Pietschmann, and E.I. Pécheur. 2009.** Low pH-dependent hepatitis C virus membrane fusion depends on E2 integrity, target lipid composition, and density of virus particles. *Journal of Biological Chemistry*. **284**:17657-17667.

**Hamamoto, I., Y. Nishimura, T. Okamoto, H. Aizaki, M. Liu, Y. Mori, T. Abe, T. Suzuki, M.M.C. Lai, T. Miyamura, K. Moriishi, and Y. Matsuura. 2005.** Human VAP-B is involved in hepatitis C virus replication through interaction with NS5A and NS5B. *Journal of Virology*. **79**:13473-13482.

**Han, Q., C. Xu, C. Wu, W. Zhu, R. Yang, and X. Chen. 2009.** Compensatory mutations in NS3 and NS5A proteins enhance the virus production capability of hepatitis C reporter virus. *Virus Research*. **145**:63-73.

**Harrison, S.C. 2008.** Viral membrane fusion. *Nature Structural & Molecular Biology*. **15**:690-698.

**He, L.F., D. Alling, T. Popkin, M. Shapiro, H.J. Alter, and R.H. Purcell. 1987.** Determining the size of non-A, non-B hepatitis virus by filtration. *Journal of Infectious Diseases*. **156**:636-640.

**He, W., L.X. Li, Q.J. Liao, C.L. Liu, and X.L. Chen. 2011.** Epigallocatechin gallate inhibits HBV DNA synthesis in a viral replication-inducible cell line. *World Journal Gastroenterology*. **17**:1507-1514.

**Helle, F., A. Goffard, V. Morel, G. Duverlie, J. McKeating, Z.Y. Keck, S. Fong, F. Penin, J. Dubuisson, and C. Voisset. 2007.** The neutralizing activity of anti-hepatitis C virus antibodies is modulated by specific glycans on the E2 envelope protein. *Journal of Virology*. **81**:8101-8111.

**Helle, F., G. Vieyres, L. Elkrief, C.I. Popescu, C. Wychowski, V. Descamps, S. Castelain, P. Roingeard, G. Duverlie, and J. Dubuisson. 2010.** Role of N-linked glycans in the functions of hepatitis C virus envelope proteins incorporated into infectious virions. *Journal of Virology*. **84**:11905-11915.

- Herrmann, E., A.U. Neumann, J.M. Schmidt, and S. Zeuzem. 2000.** Hepatitis C virus kinetics. *Antiviral Therapy*. **5**:85-90.
- Herrmann, K.M., and L.M. Weaver. 1999.** The shikimate pathway. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. **50**:473-503.
- Hézode, C., N. Forestier, G. Dusheiko, P. Ferenci, S. Pol, T. Goeser, J.P. Bronowicki, M. Bourlière, S. Gharakhanian, L. Bengtsson, L. McNair, S. George, T. Kieffer, A. Kwong, R.S. Kauffman, J. Alam, J.M. Pawlotsky, S. Zeuzem, PROVE2 Study Team. 2009.** Telaprevir and peginterferon with or without ribavirin for chronic HCV infection. *New England Journal of Medicine*. **360**:1839-1850.
- Hidalgo, M., and D. Bloedow. 2003.** Pharmacokinetics and pharmacodynamics: maximizing the clinical potential of Erlotinib (Tarceva). *Seminars in Oncology*. **30**:25-33.
- Hijikata, M., N. Kato, Y. Ootsuyama, M. Nakagawa, and K. Shimotohno. 1991.** Gene mapping of the putative structural region of the hepatitis C virus genome by *in vitro* processing analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **88**:5547-5551.
- Hijikata, M., Y.K. Shimizu, H. Kato, A. Iwamoto, J.W. Shih, H.J. Alter, R.H. Purcell, and H. Yoshikura. 1993.** Equilibrium centrifugation studies of hepatitis C virus: evidence for circulating immune complexes. *Journal of Virology*. **67**:1953-1958.
- Hijikata, M., K. Mizuno, T. Rikihisa, Y.K. Shimizu, A. Iwamoto, N. Nakajima, and H. Yoshikura. 1995.** Selective transmission of hepatitis C virus *in vivo* and *in vitro*. *Archives of Virology*. **140**:1623-1628.
- Hiroishi, K., T. Ito, and M. Imawari. 2008.** Immune responses in hepatitis C virus infection and mechanisms of hepatitis C virus persistence. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. **23**:1473-1482.
- Ho, H.Y., M.L. Cheng, S.-F. Weng, Y.L. Leu, and D.T.Y. Chiu. 2009.** Antiviral effect of epigallocatechin gallate on enterovirus 71. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **57**:6140-6147.
- Hoffmann, R.M., H.M. Diepolder, R. Zachoval, F.M. Zwiebel, M.C. Jung, S. Scholz, H. Nitschko, G. Riethmüller, and G.R. Pape. 1995.** Mapping of immunodominant CD4+ T lymphocyte epitopes of hepatitis C virus antigens and their relevance during the course of chronic infection. *Hepatology*. **21**:632-638.
- Hollman, P.C., and M.B. Katan. 1997.** Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. **51**:305-310.
- Honda, M., E.A. Brown, and S.M. Lemon. 1996.** Stability of a stem-loop involving the initiator AUG controls the efficiency of internal initiation of translation on hepatitis C virus RNA. *RNA*. **2**:955-968.
- Honda, M., M.R. Beard, L.H. Ping, and S.M. Lemon. 1999.** A phylogenetically conserved stem-loop structure at the 5' border of the internal ribosome entry site of hepatitis C virus is required for cap-independent viral translation. *Journal of Virology*. **73**:1165-1174.

**Hoofnagle, J.H., K.D. Mullen, and D.B. Jones. 1986.** Treatment of chronic non-A, non-B hepatitis with recombinant human alpha interferon. A preliminary report. *New England Journal of Medicine*. **315**:1575-1578.

**Hoofnagle, J.H. 2002.** Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology*. **36 (Suppl 5B)**:21-29.

**Hosui, A., K. Ohkawa, H. Ishida, A. Sato, F. Nakanishi, K. Ueda, T. Takehara, A. Kasahara, Y. Sasaki, M. Hori, and N. Hayashi. 2003.** Hepatitis C virus core protein differently regulates the JAK-STAT signaling pathway under interleukin-6 and interferon-gamma stimuli. *Journal of Biological Chemistry*. **278**:28562-28571.

**Houghton, M., and S. Abrignani. 2005.** Prospects for a vaccine against the hepatitis C virus. *Nature*. **436**:961-966.

**Hsu, M., J. Zhang, M. Flint, C. Logvinoff, C. Cheng-Mayer, C.M. Rice, and J.A. McKeating. 2003.** Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **100**:7271-7276.

**Huang, H., F. Sun, D.M. Owen, W. Li, Y. Chen, M. Gale, and J. Ye. 2007.** Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **104**:5848-5853.

**Huang, L., J. Hwang, S.D. Sharma, M.R.S. Hargittai, Y. Chen, J.J. Arnold, K.D. Raney, and C.E. Cameron. 2005.** Hepatitis C virus nonstructural protein 5A (NS5A) is an RNA-binding protein. *Journal of Biological Chemistry*. **280**:36417-36428.

**Huang, P., D.A. Goff, Q. Huang, A. Martinez, X. Xu, S. Crowder, S.D. Issakani, E. Anderson, N. Sheng, P. Achacoso, A. Yen, T. Kinsella, I.S. Darwish, R. Kolluri, H. Hong, K. Qu, E. Stauffer, E. Goldstein, R. Singh, D.G. Payan, and H.H. Lu. 2008.** Discovery and characterization of substituted diphenyl heterocyclic compounds as potent and selective inhibitors of hepatitis C virus replication. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **52**:1419-1429.

**Hügler, T., F. Fehrman, E. Bieck, M. Kohara, H.G. Kräusslich, C.M. Rice, H.E. Blum, and D. Moradpour. 2001.** The hepatitis C virus nonstructural protein 4B is an integral endoplasmic reticulum membrane protein. *Virology*. **284**:70-81.

## **I**

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

**Ikeda, M., M. Yi, K. Li, and S.M. Lemon. 2002.** Selectable subgenomic and genome-length dicistronic RNAs derived from an infectious molecular clone of the HCV-N strain of hepatitis C virus replicate efficiently in cultured Huh7 cells. *Journal of Virology*. **76**:2997-3006.

**Isaacs, C.E., G.Y. Wen, W. Xu, J.H. Jia, L. Rohan, C. Corbo, V. Di Maggio, E.C. Jenkins, and S. Hillier. 2008.** Epigallocatechin gallate inactivates clinical isolates of herpes simplex virus. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **52**:962-970.

**Isaacs, C.E., W. Xu, G. Merz, S. Hillier, L. Rohan, and G.Y. Wen. 2011.** Digallate dimers of (-)-epigallocatechin gallate inactivate herpes simplex virus. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **55**:5646-5653.

**Ishibashi, H., M. Nakamura, A. Komori, K. Migita, and S. Shimoda. 2009.** Liver architecture, cell function, and disease. *Seminars in Immunopathology*. **31**:399-409.

**Ito, T., J. Mukaigawa, J. Zuo, Y. Hirabayashi, K. Mitamura, and K. Yasui. 1996.** Cultivation of hepatitis C virus in primary hepatocyte culture from patients with chronic hepatitis C results in release of high titre infectious virus. *Journal of General Virology*. **77**:1043-1054.

## J

**Jackel-Cram, C., L.A. Babiuk, and Q. Liu. 2007.** Up-regulation of fatty acid synthase promoter by hepatitis C virus core protein: genotype-3a core has a stronger effect than genotype-1b core. *Journal of Hepatology*. **46**:999-1008.

**Jacobson, I.M., J.G. McHutchison, G. Dusheiko, A.M. Di Bisceglie, K.R. Reddy, N.H. Bzowej, P. Marcellin, A.J. Muir, P. Ferenci, R. Flisiak, J. George, M. Rizzetto, D. Shouval, R. Solá, R.A. Terg, E.M. Yoshida, N. Adda, L. Bengtsson, A.J. Sankoh, T.L. Kieffer, S. George, R.S. Kauffman, S. Zeuzem, ADVANCE Study Team. 2011.** Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection. *New England Journal of Medicine*. **364**:2405-2416.

**Jensen, T.B., J.M. Gottwein, T.K.H. Scheel, A.M. Hoegh, J. Eugen-Olsen, and J. Bukh. 2008.** Highly efficient JFH1-based cell-culture system for hepatitis C virus genotype 5a: failure of homologous neutralizing-antibody treatment to control infection. *Journal of Infectious Diseases*. **198**:1756-1765.

**Ji, H., C.S. Fraser, Y. Yu, J. Leary, and J.A. Doudna. 2004.** Coordinated assembly of human translation initiation complexes by the hepatitis C virus internal ribosome entry site RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **101**:16990-16995.

**Jiang, J., and G. Luo. 2009.** Apolipoprotein E but not B is required for the formation of infectious hepatitis C virus particles. *Journal of Virology*. **83**:12680-12691.

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

**Jirasko, V., R. Montserret, N. Appel, A. Janvier, L. Eustachi, C. Brohm, E. Steinmann, T. Pietschmann, F. Penin, and R. Bartenschlager. 2008.** Structural and functional characterization of nonstructural protein 2 for its role in hepatitis C virus assembly. *Journal of Biological Chemistry*. **283**:28546-28562.

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

**Jones, C.T., C.L. Murray, D.K. Eastman, J. Tassello, and C.M. Rice. 2007.** Hepatitis C virus p7 and NS2 proteins are essential for production of infectious virus. *Journal of Virology*. **81**:8374-8383.

**Jones, D.M., A.H. Patel, P. Targett-Adams, and J. McLauchlan. 2009.** The hepatitis C virus NS4B protein can trans-complement viral RNA replication and modulates production of infectious virus. *Journal of Virology*. **83**:2163-2177.

**Jopling, C.L., M.K. Yi, A.M. Lancaster, and S.M. Lemon. 2005.** Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science*. **309**:1577-1581.

**Jopling, C.L. 2008.** Regulation of hepatitis C virus by microRNA-122. *Biochemical Society Transactions*. **36**:1220-1223.

## K

**Kaito, M., S. Watanabe, K. Tsukiyama-Kohara, K. Yamaguchi, Y. Kobayashi, M. Konishi, M. Yokoi, S. Ishida, S. Suzuki, and M. Kohara. 1994.** Hepatitis C virus particle detected by immunoelectron microscopic study. *Journal of General Virology*. **75**:1755-1760.

**Kalinina, O., H. Norder, S. Mukomolov, and L.O. Magnius. 2002.** A natural intergenotypic recombinant of hepatitis C virus identified in St. Petersburg. *Journal of Virology*. **76**:4034-4043.

**Kanda, T., R. Steele, R. Ray, and R.B. Ray. 2007.** Small interfering RNA targeted to hepatitis C virus 5' nontranslated region exerts potent antiviral effect. *Journal of Virology*. **81**:669-676.

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

**Kapoor, A., P. Simmonds, G. Gerold, N. Qaisar, K. Jain, J.A. Henriquez, C. Firth, D.L. Hirschberg, C.M. Rice, S. Shields, and W.I. Lipkin. 2011.** Characterization of a canine homolog of hepatitis C virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **108**:11608-11613.

**Kato, N., T. Nakazawa, T. Mizutani, and K. Shimotohno. 1995.** Susceptibility of human T-lymphotropic virus type I infected cell line MT-2 to hepatitis C virus infection. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **206**:863-869.

**Kato, T., T. Date, M. Miyamoto, A. Furusaka, K. Tokushige, M. Mizokami, and T. Wakita. 2003.** Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. *Gastroenterology*. **125**:1808-1817.

- Kato, T., T. Matsumura, T. Heller, S. Saito, R.K. Sapp, K. Murthy, T. Wakita, and T.J. Liang. 2007.** Production of infectious hepatitis C virus of various genotypes in cell cultures. *Journal of Virology*. **81**:4405-4411.
- Kaul, A., S. Stauffer, C. Berger, T. Pertel, J. Schmitt, S. Kallis, M. Zayas, V. Lohmann, J. Luban, R. Bartenschlager. 2009.** Essential role of cyclophilin A for hepatitis C virus production and possible link to polyprotein cleavage kinetics. *PLoS Pathogens*. **5**:e1000546.
- Kawai, K., N.H. Tsuno, J. Kitayama, Y. Okaji, K. Yazawa, M. Asakage, N. Hori, T. Watanabe, K. Takahashi, and H. Nagawa. 2003.** Epigallocatechin gallate, the main component of tea polyphenol, binds to CD4 and interferes with gp120 binding. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. **112**:951-957.
- Kay, C.D., G. Mazza, B.J. Holub, and J. Wang. 2004.** Anthocyanin metabolites in human urine and serum. *British Journal of Nutrition*. **91**:933-942.
- Kay, C.D., G.J. Mazza, and B.J. Holub. 2005.** Anthocyanins exist in the circulation primarily as metabolites in adult men. *Journal of Nutrition*. **135**:2582-2588.
- Kearney, K.R., J.J. Thornton, and V.J. Navarro. 2008.** Taribavirin for the treatment of chronic hepatitis C. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. **9**:3243-3249.
- Keck, Z.Y., J. Xia, Z. Cai, T.K. Li, A.M. Owsianka, A.H. Patel, G. Luo, and S.K.H. Fong. 2007.** Immunogenic and functional organization of hepatitis C virus (HCV) glycoprotein E2 on infectious HCV virions. *Journal of Virology*. **81**:1043-1047.
- Kesic, M.J., S.O. Simmons, R. Bauer, and I. Jaspers. 2011.** Nrf2 expression modifies influenza A entry and replication in nasal epithelial cells. *Free Radical Biology & Medicine*. **51**:444-453.
- Khakoo, S.I., C.L. Thio, M.P. Martin, C.R. Brooks, X. Gao, J. Astemborski, J. Cheng, J.J. Goedert, D. Vlahov, M. Hilgartner, S. Cox, A.-M. Little, G.J. Alexander, M.E. Cramp, S.J. O'Brien, W.M.C. Rosenberg, D.L. Thomas, and M. Carrington. 2004.** HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science*. **305**:872-874.
- Khattab, M.A. 2009.** Targeting host factors: a novel rationale for the management of hepatitis C virus. *World Journal of Gastroenterology*. **15**:3472-3479.
- Khoo, U.S., K.Y.K. Chan, V.S.F. Chan, and C.L.S. Lin. 2008.** DC-SIGN and L-SIGN: the SIGNs for infection. *Journal of Molecular Medicine*. **86**:861-874.
- Kim, J.L., K.A. Morgenstern, C. Lin, T. Fox, M.D. Dwyer, J.A. Landro, S.P. Chambers, W. Markland, C.A. Lepre, E.T. O'Malley, S.L. Harbeson, C.M. Rice, M.A. Murcko, P.R. Caron, and J.A. Thomson. 1996.** Crystal structure of the hepatitis C virus NS3 protease domain complexed with a synthetic NS4A cofactor peptide. *Cell*. **87**:343-355.
- Kim, S.J., J.H. Kim, Y.G. Kim, H.S. Lim, and J.W. Oh. 2004.** Protein kinase C-related kinase 2 regulates hepatitis C virus RNA polymerase function by phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*. **279**:50031-50041.

- Kim, Y.K., C.S. Kim, S.H. Lee, and S.K. Jang. 2002.** Domains I and II in the 5' nontranslated region of the HCV genome are required for RNA replication. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **290**:105-112.
- Kiser, J.J., J.R. Burton, P.L. Anderson, and G.T. Everson. 2012.** Review and management of drug interactions with boceprevir and telaprevir. *Hepatology*. **55**:1620-1628.
- Klade, C.S., H. Wedemeyer, T. Berg, H. Hinrichsen, G. Cholewinska, S. Zeuzem, H. Blum, M. Buschle, S. Jelovcan, V. Buerger, E. Tauber, J. Frisch, and M.P. Manns. 2008.** Therapeutic vaccination of chronic hepatitis C nonresponder patients with the peptide vaccine IC41. *Gastroenterology*. **134**:1385-1395.
- Klein, K.C., S.J. Polyak, and J.R. Lingappa. 2004.** Unique features of hepatitis C virus capsid formation revealed by de novo cell-free assembly. *Journal of Virology*. **78**:9257-9269.
- Klein, K.C., S.R. Dellos, and J.R. Lingappa. 2005.** Identification of residues in the hepatitis C virus core protein that are critical for capsid assembly in a cell-free system. *Journal of Virology*. **79**:6814-6826.
- Kobayashi, F., S. Yamada, S. Taguwa, C. Kataoka, S. Naito, Y. Hama, H. Tani, Y. Matsuura, and K. Sugahara. 2012.** Specific interaction of the envelope glycoproteins E1 and E2 with liver heparan sulfate involved in the tissue tropism infection by hepatitis C virus. *Glycoconjugate Journal*. **29**:211-220.
- Koch, J.O., and R. Bartenschlager. 1999.** Modulation of hepatitis C virus NS5A hyperphosphorylation by nonstructural proteins NS3, NS4A, and NS4B. *Journal of Virology*. **73**:7138-7146.
- Kolykhalov, A.A., S.M. Feinstone, and C.M. Rice. 1996.** Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *Journal of Virology*. **70**:3363-3371.
- Kolykhalov, A.A., K. Mihalik, S.M. Feinstone, and C.M. Rice. 2000.** Hepatitis C virus-encoded enzymatic activities and conserved RNA elements in the 3' nontranslated region are essential for virus replication *in vivo*. *Journal of Virology*. **74**:2046-2051.
- Koppel, E.A., K.P.J.M. van Gisbergen, T.B.H. Geijtenbeek, and Y. van Kooyk. 2005.** Distinct functions of DC-SIGN and its homologues L-SIGN (DC-SIGNR) and mSIGNR1 in pathogen recognition and immune regulation. *Cellular Microbiology*. **7**:157-165.
- Koutsoudakis, G., A. Kaul, E. Steinmann, S. Kallis, V. Lohmann, T. Pietschmann, and R. Bartenschlager. 2006.** Characterization of the early steps of hepatitis C virus infection by using luciferase reporter viruses. *Journal of Virology*. **80**:5308-5320.
- Koutsoudakis, G., E. Herrmann, S. Kallis, R. Bartenschlager, and T. Pietschmann. 2007.** The level of CD81 cell surface expression is a key determinant for productive entry of hepatitis C virus into host cells. *Journal of Virology*. **81**:588-598.
- Kramer, J.R., F. Kanwal, P. Richardson, M. Mei, and H.B. El-Serag. 2012.** Gaps in the achievement of effectiveness of HCV treatment in national VA practice. *Journal of Hepatology*. **56**:320-325.

**Krey, T., J. d'Alayer, C.M. Kikuti, A. Saulnier, L. Damier-Piolle, I. Petitpas, D.X. Johansson, R.G. Tawar, B. Baron, B. Robert, P. England, M.A.A. Persson, A. Martin, and F.A. Rey. 2010.** The disulfide bonds in glycoprotein E2 of hepatitis C virus reveal the tertiary organization of the molecule. *PLoS Pathogens*. **6**:e1000762.

**Krieger, N., V. Lohmann, and R. Bartenschlager. 2001.** Enhancement of hepatitis C virus RNA replication by cell culture-adaptive mutations. *Journal of Virology*. **75**:4614-4624.

**Krul, E.S., M.J. Tikkanen, T.G. Cole, J.M. Davie, and G. Schonfeld. 1985.** Roles of apolipoproteins B and E in the cellular binding of very low-density lipoproteins. *Journal of Clinical Investigation*. **75**:361-369.

**Kuang, W.F., Y.C. Lin, F. Jean, Y.W. Huang, C.L. Tai, D.S. Chen, P.J. Chen, and L.H. Hwang. 2004.** Hepatitis C virus NS3 RNA helicase activity is modulated by the two domains of NS3 and NS4A. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **317**:211-217.

**Kumthip, K., P. Chusri, N. Jilg, L. Zhao, D.N. Fusco, H. Zhao, K. Goto, D. Cheng, E.A. Schaefer, L. Zhang, C. Pantip, S. Thongsawat, A. O'Brien, L.F. Peng, N. Maneekarn, R.T. Chung, and W. Lin. 2012.** Hepatitis C virus NS5A disrupts STAT1 phosphorylation and suppresses type I interferon signaling. *Journal of Virology*. **86**:8581-8591.

**Kunkel, M., M. Lorinczi, R. Rijnbrand, S.M. Lemon, and S.J. Watowich. 2001.** Self-assembly of nucleocapsid-like particles from recombinant hepatitis C virus core protein. *Journal of Virology*. **75**:2119-2129.

**Kuo, G., Q.L. Choo, H.J. Alter, G.L. Gitnick, A.G. Redeker, R.H. Purcell, T. Miyamura, J.L. Dienstag, M.J. Alter, and C.E. Stevens. 1989.** An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science*. **244**:362-364.

**Kwo, P.Y., E.J. Lawitz, J. McCone, E.R. Schiff, J.M. Vierling, D. Pound, M.N. Davis, J.S. Galati, S.C. Gordon, N. Ravendhran, L. Rossaro, F.H. Anderson, I.M. Jacobson, R. Rubin, K. Koury, L.D. Pedicone, C.A. Brass, E. Chaudhri, and J.K. Albrecht. 2010.** Efficacy of boceprevir, an NS3 protease inhibitor, in combination with peginterferon alfa-2b and ribavirin in treatment-naïve patients with genotype 1 hepatitis C infection (SPRINT-1): an open-label, randomised, multicentre phase 2 trial. *Lancet*. **376**:705-716.

## L

**Lagging, L.M., K. Meyer, R.J. Owens, and R. Ray. 1998.** Functional role of hepatitis C virus chimeric glycoproteins in the infectivity of pseudotyped virus. *Journal of Virology*. **72**:3539-3546.

**Lai, M.E., A.P. Mazzoleni, F. Argiolu, S. De Virgilis, A. Balestrieri, R.H. Purcell, A. Cao, and P. Farci. 1994.** Hepatitis C virus in multiple episodes of acute hepatitis in polytransfused thalassaemic children. *Lancet*. **343**:388-390.

**Lai, W.K., P.J. Sun, J. Zhang, A. Jennings, P.F. Lalor, S. Hubscher, J.A. McKeating, and D.H. Adams. 2006.** Expression of DC-SIGN and DC-SIGNR on human sinusoidal endothelium: a role for capturing hepatitis C virus particles. *American Journal of Pathology*. **169**:200-208.

- Lam, A.M.I., and D.N. Frick. 2006.** Hepatitis C virus subgenomic replicon requires an active NS3 RNA helicase. *Journal of Virology*. **80**:404-411.
- Lambert, J.D., S. Sang, and C.S. Yang. 2007.** Biotransformation of green tea polyphenols and the biological activities of those metabolites. *Molecular Pharmaceutics*. **4**:819-825.
- Lambot, M., S. Frérier, A. Op De Beeck, B. Quatannens, S. Lestavel, V. Clavey, and J. Dubuisson. 2002.** Reconstitution of hepatitis C virus envelope glycoproteins into liposomes as a surrogate model to study virus attachment. *Journal of Biological Chemistry*. **277**:20625-20630.
- Lan, K.H., K.L. Lan, W.P. Lee, M.L. Sheu, M.Y. Chen, Y.L. Lee, S.H. Yen, F.Y. Chang, and S.D. Lee. 2007.** HCV NS5A inhibits interferon-alpha signaling through suppression of STAT1 phosphorylation in hepatocyte-derived cell lines. *Journal of Hepatology*. **46**:759-767.
- Lancaster, T., E. Sanders, J.M.L. Christie, C. Brooks, S. Green, and W.M.C. Rosenberg. 2002.** Quantitative and functional differences in CD8+ lymphocyte responses in resolved acute and chronic hepatitis C virus infection. *Journal of Viral Hepatitis*. **9**:18-28.
- Lanford, R.E., L. Notvall, D. Chavez, R. White, G. Frenzel, C. Simonsen, and J. Kim. 1993.** Analysis of hepatitis C virus capsid, E1, and E2/NS1 proteins expressed in insect cells. *Virology*. **197**:225-235.
- Lanford, R.E., C. Sureau, J.R. Jacob, R. White, and T.R. Fuerst. 1994.** Demonstration of *in vitro* infection of chimpanzee hepatocytes with hepatitis C virus using strand-specific RT/PCR. *Virology*. **202**:606-614.
- Lanford, R.E., B. Guerra, C.B. Bigger, H. Lee, D. Chavez, and K.M. Brasky. 2007.** Lack of response to exogenous interferon-alpha in the liver of chimpanzees chronically infected with hepatitis C virus. *Hepatology*. **46**:999-1008.
- Lanford, R.E., E.S. Hildebrandt-Eriksen, A. Petri, R. Persson, M. Lindow, M.E. Munk, S. Kauppinen, and H. Ørum. 2010.** Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science*. **327**:198-201.
- Lavanchy, D. 2009.** The global burden of hepatitis C. *Liver International*. **29 (Suppl 1)**:74-81.
- Lavanchy, D. 2011.** Evolving epidemiology of hepatitis C virus. *Clinical Microbiology and Infection*. **17**:107-115.
- Lavie, M., C. Voisset, N. Vu-Dac, V. Zurawski, G. Duverlie, C. Wychowski, and J. Dubuisson. 2006.** Serum amyloid A has antiviral activity against hepatitis C virus by inhibiting virus entry in a cell culture system. *Hepatology*. **44**:1626-1634.
- Lavie, M., A. Goffard, and J. Dubuisson. 2007.** Assembly of a functional HCV glycoprotein heterodimer. *Current Issues in Molecular Biology*. **9**:71-86.
- Lavillette, D., A.W. Tarr, C. Voisset, P. Donot, B. Bartosch, C. Bain, A.H. Patel, J. Dubuisson, J.K. Ball, and F.L. Cosset. 2005a.** Characterization of host-range and cell entry properties of the major genotypes and subtypes of hepatitis C virus. *Hepatology*. **41**:265-274.

- Lavillette, D., Y. Morice, G. Germanidis, P. Donot, A. Soulier, E. Pagkalos, G. Sakellariou, L. Intrator, B. Bartosch, J.M. Pawlotsky, and F.L. Cosset. 2005b.** 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. *Journal of Virology*. **79**:6023-6034.
- Lavillette, D., B. Bartosch, D. Nourrisson, G. Verney, F.L. Cosset, F. Penin, and E.I. Pécheur. 2006.** Hepatitis C virus glycoproteins mediate low pH-dependent membrane fusion with liposomes. *Journal of Biological Chemistry*. **281**:3909-3917.
- Lavillette, D., E.I. Pécheur, P. Donot, J. Fresquet, J. Molle, R. Corbau, M. Dreux, F. Penin, and F.L. Cosset. 2007.** Characterization of fusion determinants points to the involvement of three discrete regions of both E1 and E2 glycoproteins in the membrane fusion process of hepatitis C virus. *Journal of Virology*. **81**:8752-8765.
- Law, M., T. Maruyama, J. Lewis, E. Giang, A.W. Tarr, Z. Stamataki, P. Gastaminza, F.V. Chisari, I.M. Jones, R.I. Fox, J.K. Ball, J.A. McKeating, N.M. Kneteman, and D.R. Burton. 2008.** Broadly neutralizing antibodies protect against hepatitis C virus quasispecies challenge. *Nature Medicine*. **14**:25-27.
- Lawitz, E., M. Rodriguez-Torres, and J. Denning. 2011.** Once daily dual-nucleotide combination of PSI-938 and PSI-7977 provides 94% HCV-RNA <LOD at day 14: first purine/pyrimidine clinical combination data (the nuclear study). *Journal of Hepatology*. **54 (Suppl 1)**:543.
- Lawitz, E.J., D. Gruener, J.M. Hill, T. Marbury, L. Moorehead, A. Mathias, G. Cheng, J.O. Link, K.A. Wong, H. Mo, J.G. McHutchison, and D.M. Brainard. 2012.** A phase 1, randomized, placebo-controlled, 3-day, dose-ranging study of GS-5885, an NS5A inhibitor, in patients with genotype 1 hepatitis C. *Journal of Hepatology*. **57**:24-31.
- Lechner, F., D.K.H. Wong, P.R. Dunbar, R. Chapman, R.T. Chung, P. Dohrenwend, G. Robbins, R. Phillips, P. Klenerman, and B.D. Walker. 2000.** Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *Journal of Experimental Medicine*. **191**:1499-1512.
- Lee, K.J., J. Choi, J.H. Ou, and M.M.C. Lai. 2004.** The C-terminal transmembrane domain of hepatitis C virus (HCV) RNA polymerase is essential for HCV replication *in vivo*. *Journal of Virology*. **78**:3797-3802.
- Lee, M.J., P. Maliakal, L. Chen, X. Meng, F.Y. Bondoc, S. Prabhu, G. Lambert, S. Mohr, and C.S. Yang. 2002.** Pharmacokinetics of tea catechins after ingestion of green tea and (-)-epigallocatechin-3-gallate by humans: formation of different metabolites and individual variability. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. **11**:1025-1032.
- Legrand, N., A. Ploss, R. Balling, P.D. Becker, C. Borsotti, N. Brezillon, J. Debarry, Y. de Jong, H. Deng, J.P. Di Santo, S. Eisenbarth, E. Eynon, R.A. Flavell, C.A. Guzman, N.D. Huntington, D. Kremsdorf, M.P. Manns, M.G. Manz, J.-J. Mention, M. Ott, C. Rathinam, C.M. Rice, A. Rongvaux, S. Stevens, H. Spits, H. Strick-Marchand, H. Takizawa, A.U. van Lent, C. Wang, K. Weijer, T. Willinger, and P. Ziegler. 2009.** Humanized mice for modeling human infectious disease: challenges, progress, and outlook. *Cell Host Microbe*. **6**:5-9.

- Legrand-Abravanel, F., J. Claudinon, F. Nicot, M. Dubois, S. Chapuy-Regaud, K. Sandres-Saune, C. Pasquier, and J. Izopet. 2007.** New natural intergenotypic (2/5) recombinant of hepatitis C virus. *Journal of Virology*. **81**:4357-4362.
- Lemon SM, Walker, C., Alter, M. J., Yi, M. 2007.** Hepatitis C virus. In *Fields Virology*, Knipe DM, Howley, P. M. (ed), Vol. 1, pp 1253-1304. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Lesburg, C.A., M.B. Cable, E. Ferrari, Z. Hong, A.F. Mannarino, and P.C. Weber. 1999.** Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase from hepatitis C virus reveals a fully encircled active site. *Nature Structural Biology*. **6**:937-943.
- Levrero, M. 2006.** Viral hepatitis and liver cancer: the case of hepatitis C. *Oncogene*. **25**:3834-3847.
- Li, J., U. Rix, B. Fang, Y. Bai, A. Edwards, J. Colinge, K.L. Bennett, J. Gao, L. Song, S. Eschrich, G. Superti-Furga, J. Koomen, and E.B. Haura. 2010.** A chemical and phosphoproteomic characterization of dasatinib action in lung cancer. *Nature Chemical Biology*. **6**:291-299.
- Li, K., E. Foy, J.C. Ferreon, M. Nakamura, A.C.M. Ferreon, M. Ikeda, S.C. Ray, M. Gale, and S.M. Lemon. 2005a.** Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **102**:2992-2997.
- Li, L., P. Stillemark-Billton, C. Beck, P. Boström, L. Andersson, M. Rutberg, J. Ericsson, B. Magnusson, D. Marchesan, A. Ljungberg, J. Borén, and S.-O. Olofsson. 2006.** Epigallocatechin gallate increases the formation of cytosolic lipid droplets and decreases the secretion of apoB-100 VLDL. *Journal of Lipid Research*. **47**:67-77.
- Li, S., T. Hattori, and E.N. Kodama. 2011.** Epigallocatechin gallate inhibits the HIV reverse transcription step. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*. **21**:239-243.
- Li, X.D., L. Sun, R.B. Seth, G. Pineda, and Z.J. Chen. 2005b.** Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the mitochondria to evade innate immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **102**:17717-17722.
- Lim, P.J., U. Chatterji, D. Cordek, S.D. Sharma, J.A. Garcia-Rivera, C.E. Cameron, K. Lin, P. Targett-Adams, and P.A. Galloway. 2012.** Correlation between NS5A Dimerization and Hepatitis C Virus Replication. *Journal of Biological Chemistry*. **287**:30861-30873.
- Lin, C., B.M. Prágai, A. Grakoui, J. Xu, and C.M. Rice. 1994.** Hepatitis C virus NS3 serine proteinase: trans-cleavage requirements and processing kinetics. *Journal of Virology*. **68**:8147-8157.
- Lin, W., S.S. Kim, E. Yeung, Y. Kamegaya, J.T. Blackard, K.A. Kim, M.J. Holtzman, and R.T. Chung. 2006.** Hepatitis C virus core protein blocks interferon signaling by interaction with the STAT1 SH2 domain. *Journal of Virology*. **80**:9226-9235.
- Lindenbach, B.D., M.J. Evans, A.J. Syder, B. Wölk, T.L. Tellinghuisen, C.C. Liu, T. Maruyama, R.O. Hynes, D.R. Burton, J.A. McKeating, and C.M. Rice. 2005.** Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science*. **309**:623-626.

- Lindenbach, B.D., P. Meuleman, A. Ploss, T. Vanwolleghem, A.J. Syder, J.A. McKeating, R.E. Lanford, S.M. Feinstone, M.E. Major, G. Leroux-Roels, and C.M. Rice. 2006.** Cell culture-grown hepatitis C virus is infectious *in vivo* and can be recultured *in vitro*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **103**:3805-3809.
- Lindenbach, B.D., B.M. Prágai, R. Montserret, R.K.F. Beran, A.M. Pyle, F. Penin, and C.M. Rice. 2007.** The C terminus of hepatitis C virus NS4A encodes an electrostatic switch that regulates NS5A hyperphosphorylation and viral replication. *Journal of Virology*. **81**:8905-8918.
- Ling, J.X., F. Wei, N. Li, J.L. Li, L.J. Chen, Y.Y. Liu, F. Luo, H.R. Xiong, W. Hou, and Z.Q. Yang. 2012.** Amelioration of influenza virus-induced reactive oxygen species formation by epigallocatechin gallate derived from green tea. *Acta Pharmacologica Sinica*. Epub ahead of print.
- Liu, Q., R.A. Bhat, A.M. Prince, and P. Zhang. 1999.** The hepatitis C virus NS2 protein generated by NS2-3 autocleavage is required for NS5A phosphorylation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **254**:572-577.
- Liu, S., I.H. Ansari, S.C. Das, and A.K. Pattnaik. 2006.** Insertion and deletion analyses identify regions of non-structural protein 5A of Hepatitis C virus that are dispensable for viral genome replication. *Journal of General Virology*. **87**:323-327.
- Liu, S., W. Yang, L. Shen, J.R. Turner, C.B. Coyne, and T. Wang. 2009a.** Tight junction proteins claudin-1 and occludin control hepatitis C virus entry and are downregulated during infection to prevent superinfection. *Journal of Virology*. **83**:2011-2014.
- Liu, Z., J.M. Robida, S. Chinnaswamy, G. Yi, J.M. Robotham, H.B. Nelson, A. Irsigler, C.C. Kao, and H. Tang. 2009b.** Mutations in the hepatitis C virus polymerase that increase RNA binding can confer resistance to cyclosporine A. *Hepatology*. **50**:25-33.
- Lo, S.Y., M.J. Selby, and J.H. Ou. 1996.** Interaction between hepatitis C virus core protein and E1 envelope protein. *Journal of Virology*. **70**:5177-5182.
- Logvinoff, C., M.E. Major, D. Oldach, S. Heyward, A. Talal, P. Balfe, S.M. Feinstone, H. Alter, C.M. Rice, and J.A. McKeating. 2004.** Neutralizing antibody response during acute and chronic hepatitis C virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **101**:10149-10154.
- Lohmann, V., F. Körner, U. Herian, and R. Bartenschlager. 1997.** Biochemical properties of hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA polymerase and identification of amino acid sequence motifs essential for enzymatic activity. *Journal of Virology*. **71**:8416-8428.
- Lohmann, V., F. Körner, J.O. Koch, U. Herian, L. Theilmann, and R. Bartenschlager. 1999.** Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science*. **285**:110-113.
- Lohmann V., J. Luban, and R. Bartenschlager. 2009.** Essential role of cyclophilin A for hepatitis C virus replication and virus production and possible link to polyprotein cleavage kinetics. *PLoS Pathogens*. **5**:e1000546.

**Lok, A.S., D.F. Gardiner, E. Lawitz, C. Martorell, G.T. Everson, R. Ghalib, R. Reindollar, V. Rustgi, F. McPhee, M. Wind-Rotolo, A. Persson, K. Zhu, D.I. Dimitrova, T. Eley, T. Guo, D.M. Grasela, and C. Pasquinelli. 2012.** Preliminary study of two antiviral agents for hepatitis C genotype 1. *New England Journal of Medicine*. **366**:216-224.

**Lorenz, I.C., J. Marcotrigiano, T.G. Dentzer, and C.M. Rice. 2006.** Structure of the catalytic domain of the hepatitis C virus NS2-3 protease. *Nature*. **442**:831-835.

**Love, R.A., H.E. Parge, J.A. Wickersham, Z. Hostomsky, N. Habuka, E.W. Moomaw, T. Adachi, and Z. Hostomska. 1996.** The crystal structure of hepatitis C virus NS3 proteinase reveals a trypsin-like fold and a structural zinc binding site. *Cell*. **87**:331-342.

**Lozach, P.Y., A. Amara, B. Bartosch, J.L. Virelizier, F. Arenzana-Seisdedos, F.L. Cosset, and R. Altmeyer. 2004.** C-type lectins L-SIGN and DC-SIGN capture and transmit infectious hepatitis C virus pseudotype particles. *Journal of Biological Chemistry*. **279**:32035-32045.

**Luckner, M. 1972.** Secondary metabolism in plants and animals. CRC Press.

**Ludwig, I.S., A.N. Lekkerkerker, E. Depla, F. Bosman, R.J.P. Musters, S. Depraetere, Y. van Kooyk, and T.B.H. Geijtenbeek. 2004.** Hepatitis C virus targets DC-SIGN and L-SIGN to escape lysosomal degradation. *Journal of Virology*. **78**:8322-8332.

**Luik, P., C. Chew, J. Aittoniemi, J. Chang, P. Wentworth, R.A. Dwek, P.C. Biggin, C. Vénien-Bryan, and N. Zitzmann. 2009.** The 3-dimensional structure of a hepatitis C virus p7 ion channel by electron microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **106**:12712-12716.

**Lundin, M., M. Monné, A. Widell, G. Von Heijne, and M.A.A. Persson. 2003.** Topology of the membrane-associated hepatitis C virus protein NS4B. *Journal of Virology*. **77**:5428-5438.

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

**Luscombe, C.A., Z. Huang, M.G. Murray, M. Miller, J. Wilkinson, and G.D. Ewart. 2010.** A novel Hepatitis C virus p7 ion channel inhibitor, BIT225, inhibits bovine viral diarrhea virus *in vitro* and shows synergism with recombinant interferon-alpha-2b and nucleoside analogues. *Antiviral Research*. **86**:144-153.

## **M**

**Ma, H.C., C.H. Ke, T.Y. Hsieh, and S.Y. Lo. 2002.** The first hydrophobic domain of the hepatitis C virus E1 protein is important for interaction with the capsid protein. *Journal of General Virology*. **83**:3085-3092.

- Ma, Y., J. Yates, Y. Liang, S.M. Lemon, and M. Yi. 2008.** NS3 helicase domains involved in infectious intracellular hepatitis C virus particle assembly. *Journal of Virology*. **82**:7624-7639.
- Ma, Y., M. Anantpadma, J.M. Timpe, S. Shanmugam, S.M. Singh, S.M. Lemon, and M. Yi. 2011.** Hepatitis C virus NS2 protein serves as a scaffold for virus assembly by interacting with both structural and nonstructural proteins. *Journal of Virology*. **85**:86-97.
- MacArthur, K.L., C.H. Wu, and G.Y. Wu. 2012.** Animal models for the study of hepatitis C virus infection and replication. *World Journal of Gastroenterology*. **18**:2909-2913.
- Mahias, K., N. Ahmed-El-Sayed, C. Masante, J. Bitard, C. Staedel, F. Darfeuille, M. Ventura, and T. Astier-Gin. 2010.** Identification of a structural element of the hepatitis C virus minus strand RNA involved in the initiation of RNA synthesis. *Nucleic Acids Research*. **38**:4079-4091.
- Maillard, P., K. Krawczynski, J. Nitkiewicz, C. Bronnert, M. Sidorkiewicz, P. Gounon, J. Dubuisson, G. Faure, R. Crainic, and A. Budkowska. 2001.** Nonenveloped nucleocapsids of hepatitis C virus in the serum of infected patients. *Journal of Virology*. **75**:8240-8250.
- Maillard, P., T. Huby, U. Andréo, M. Moreau, J. Chapman, and A. Budkowska. 2006.** The interaction of natural hepatitis C virus with human scavenger receptor SR-BI/Cla1 is mediated by ApoB-containing lipoproteins. *FASEB Journal*. **20**:735-737.
- Major, M.E. 2009.** Prophylactic and Therapeutic Vaccination against Hepatitis C Virus (HCV): Developments and Future Perspectives. *Viruses*. **1**:144-165.
- Manach, C., G. Williamson, C. Morand, A. Scalbert, and C. Rémésy. 2005.** Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *American Journal of Clinical Nutrition*. **81 (Suppl 1)**:230–242.
- Manns, M.P., J.G. McHutchison, S.C. Gordon, V.K. Rustgi, M. Shiffman, R. Reindollar, Z.D. Goodman, K. Koury, M. Ling, and J.K. Albrecht. 2001.** Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet*. **358**:958-965.
- Marcellin, P., R.G. Gish, N. Gitlin, J. Heise, D.G. Halliman, E. Chun, and M. Rodriguez-Torres. 2010.** Safety and efficacy of viramidine versus ribavirin in ViSER2: randomized, double-blind study in therapy-naïve hepatitis C patients. *Journal of Hepatology*. **52**:32-38.
- Markland, W., T.J. McQuaid, J. Jain, and A.D. Kwong. 2000.** Broad-spectrum antiviral activity of the IMP dehydrogenase inhibitor VX-497: a comparison with ribavirin and demonstration of antiviral additivity with alpha interferon. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **44**:859-866.
- Masaki, T., R. Suzuki, K. Murakami, H. Aizaki, K. Ishii, A. Murayama, T. Date, Y. Matsuura, T. Miyamura, T. Wakita, and T. Suzuki. 2008.** Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus particles. *Journal of Virology*. **82**:7964-7976.

- Matsuura, Y., S. Harada, R. Suzuki, Y. Watanabe, Y. Inoue, I. Saito, and T. Miyamura. 1992.** Expression of processed envelope protein of hepatitis C virus in mammalian and insect cells. *Journal of Virology*. **66**:1425-1431.
- Matsuura, Y., H. Tani, K. Suzuki, T. Kimura-Someya, R. Suzuki, H. Aizaki, K. Ishii, K. Moriishi, C.S. Robison, M.A. Whitt, and T. Miyamura. 2001.** Characterization of pseudotype VSV possessing HCV envelope proteins. *Virology*. **286**:263-275.
- Maurin, G., J. Fresquet, O. Granio, C. Wychowski, F.L. Cosset, and D. Lavillette. 2011.** Identification of interactions in the E1E2 heterodimer of hepatitis C virus important for cell entry. *Journal of Biological Chemistry*. **286**:23865-23876.
- McCormick, C.J., D. Brown, S. Griffin, L. Challinor, D.J. Rowlands, and M. Harris. 2006.** A link between translation of the hepatitis C virus polyprotein and polymerase function; possible consequences for hyperphosphorylation of NS5A. *Journal of General Virology*. **87**:93-102.
- McHutchison, J.G., S.C. Gordon, E.R. Schiff, M.L. Shiffman, W.M. Lee, V.K. Rustgi, Z.D. Goodman, M.H. Ling, S. Cort, and J.K. Albrecht. 1998.** Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. *New England Journal of Medicine*. **339**:1485-1492.
- McHutchison, J.G., G.T. Everson, S.C. Gordon, I.M. Jacobson, M. Sulkowski, R. Kauffman, L. McNair, J. Alam, A.J. Muir, PROVE1 Study Team. 2009.** Telaprevir with peginterferon and ribavirin for chronic HCV genotype 1 infection. *New England Journal of Medicine*. **360**:1827-1838.
- McKay, D.L., and J.B. Blumberg. 2002.** The role of tea in human health: an update. *Journal of the American College of Nutrition*. **21**:1-13.
- McLauchlan, J. 2009.** Hepatitis C virus: viral proteins on the move. *Biochemical Society Transactions*. **37**:986-990.
- McMullan, L.K., A. Grakoui, M.J. Evans, K. Mihalik, M. Puig, A.D. Branch, S.M. Feinstone, and C.M. Rice. 2007.** Evidence for a functional RNA element in the hepatitis C virus core gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **104**:2879-2884.
- Meertens, L., C. Bertaux, and T. Dragic. 2006.** Hepatitis C virus entry requires a critical postinternalization step and delivery to early endosomes via clathrin-coated vesicles. *Journal of Virology*. **80**:11571-11578.
- Meertens, L., C. Bertaux, L. Cukierman, E. Cormier, D. Lavillette, F.L. Cosset, and T. Dragic. 2008.** The tight junction proteins claudin-1, -6, and -9 are entry cofactors for hepatitis C virus. *Journal of Virology*. **82**:3555-3560.
- Mehta, S.H., A. Cox, D.R. Hoover, X.H. Wang, Q. Mao, S. Ray, S.A. Strathdee, D. Vlahov, and D.L. Thomas. 2002.** Protection against persistence of hepatitis C. *Lancet*. **359**:1478-1483.

- Mercer, D.F., D.E. Schiller, J.F. Elliott, D.N. Douglas, C. Hao, A. Rinfret, W.R. Addison, K.P. Fischer, T.A. Churchill, J.R. Lakey, D.L. Tyrrell, and N.M. Kneteman. 2001.** Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nature Medicine*. **7**:927-933.
- Merken, H.M., and G.R. Beecher. 2000.** Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **48**:577-599.
- Meuleman, P., L. Libbrecht, R. De Vos, B. de Hemptinne, K. Gevaert, J. Vandekerckhove, T. Roskams, and G. Leroux-Roels. 2005.** Morphological and biochemical characterization of a human liver in a uPA-SCID mouse chimera. *Hepatology*. **41**:847-856.
- Meuleman, P., and G. Leroux-Roels. 2008.** The human liver-uPA-SCID mouse: a model for the evaluation of antiviral compounds against HBV and HCV. *Antiviral Research*. **80**:231-238.
- Meuleman, P., J. Hesselgesser, M. Paulson, T. Vanwolleghem, I. Desombere, H. Reiser, and G. Leroux-Roels. 2008.** Anti-CD81 antibodies can prevent a hepatitis C virus infection *in vivo*. *Hepatology*. **48**:1761-1768.
- Meuleman, P., J. Bukh, L. Verhoye, A. Farhoudi, T. Vanwolleghem, R.Y. Wang, I. Desombere, H. Alter, R.H. Purcell, and G. Leroux-Roels. 2011a.** *In vivo* evaluation of the cross-genotype neutralizing activity of polyclonal antibodies against hepatitis C virus. *Hepatology*. **53**:755-762.
- Meuleman, P., A. Albecka, S. Belouzard, K. Vercauteren, L. Verhoye, C. Wychowski, G. Leroux-Roels, K.E. Palmer, and J. Dubuisson. 2011b.** Griffithsin has antiviral activity against hepatitis C virus. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **55**:5159-5167.
- Meuleman, P., M.T. Catanese, L. Verhoye, I. Desombere, A. Farhoudi, C.T. Jones, T. Sheahan, K. Grzyb, R. Cortese, C.M. Rice, G. Leroux-Roels, and A. Nicosia. 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.
- Meunier, J.C., A. Fournillier, A. Choukhi, A. Cahour, L. Cocquerel, J. Dubuisson, and C. Wychowski. 1999.** Analysis of the glycosylation sites of hepatitis C virus (HCV) glycoprotein E1 and the influence of E1 glycans on the formation of the HCV glycoprotein complex. *Journal of General Virology*. **80**:887-896.
- Meunier, J.C., R.E. Engle, K. Faulk, M. Zhao, B. Bartosch, H. Alter, S.U. Emerson, F.L. Cosset, R.H. Purcell, and J. Bukh. 2005.** Evidence for cross-genotype neutralization of hepatitis C virus pseudo-particles and enhancement of infectivity by apolipoprotein C1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **102**:4560-4565.
- Meunier, J.C., R.S. Russell, R.E. Engle, K.N. Faulk, R.H. Purcell, and S.U. Emerson. 2008.** Apolipoprotein C1 association with hepatitis C virus. *Journal of Virology*. **82**:9647-9656.

- Meylan, E., J. Curran, K. Hofmann, D. Moradpour, M. Binder, R. Bartenschlager, and J. Tschopp. 2005.** Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature*. **437**:1167-1172.
- Michalak, J.P., C. Wychowski, A. Choukhi, J.C. Meunier, S. Ung, C.M. Rice, and J. Dubuisson. 1997.** Characterization of truncated forms of hepatitis C virus glycoproteins. *Journal of General Virology*. **78**:2299-2306.
- Minoda, K., T. Ichikawa, T. Katsumata, K.I. Onobori, T. Mori, Y. Suzuki, T. Ishii, and T. Nakayama. 2010.** Influence of the galloyl moiety in tea catechins on binding affinity for human serum albumin. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*. **56**:331-334.
- Miyanari, Y., K. Atsuzawa, N. Usuda, K. Watashi, T. Hishiki, M. Zayas, R. Bartenschlager, T. Wakita, M. Hijikata, and K. Shimotohno. 2007.** The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nature Cell Biology*. **9**:1089-1097.
- Molina, S., V. Castet, C. Fournier-Wirth, L. Pichard-Garcia, R. Avner, D. Harats, J. Roitelman, R. Barbaras, P. Graber, P. Ghera, M. Smolarsky, A. Funaro, F. Malavasi, D. Larrey, J. Coste, J.M. Fabre, A. Sa-Cunha, and P. Maurel. 2007.** The low-density lipoprotein receptor plays a role in the infection of primary human hepatocytes by hepatitis C virus. *Journal of Hepatology*. **46**:411-419.
- Montpellier, C., B.A. Tews, J. Poitrimole, V. Rocha-Perugini, V. D'Arienzo, J. Potel, X.A. Zhang, E. Rubinstein, J. Dubuisson, and L. Cocquerel. 2011.** Interacting regions of CD81 and two of its partners, EWI-2 and EWI-2wint, and their effect on hepatitis C virus infection. *Journal of Biological Chemistry*. **286**:13954-13965.
- Moradpour, D., M.J. Evans, R. Gosert, Z. Yuan, H.E. Blum, S.P. Goff, B.D. Lindenbach, and C.M. Rice. 2004a.** Insertion of green fluorescent protein into nonstructural protein 5A allows direct visualization of functional hepatitis C virus replication complexes. *Journal of Virology*. **78**:7400-7409.
- Moradpour, D., V. Brass, E. Bieck, P. Friebe, R. Gosert, H.E. Blum, R. Bartenschlager, F. Penin, and V. Lohmann. 2004b.** Membrane association of the RNA-dependent RNA polymerase is essential for hepatitis C virus RNA replication. *Journal of Virology*. **78**:13278-13284.
- Moradpour, D., V. Brass, and F. Penin. 2005.** Function follows form: the structure of the N-terminal domain of HCV NS5A. *Hepatology*. **42**:732-735.
- Morel, V., V. Descamps, C. François, C. Fournier, E. Brochet, D. Capron, G. Duverlie, and S. Castelain. 2010.** Emergence of a genomic variant of the recombinant 2k/1b strain during a mixed Hepatitis C infection: a case report. *Journal of Clinical Virology*. **47**:382-386.
- Moreno, C., T. Berg, T. Tanwandee, S. Thongsawat, H. Van Vlierberghe, S. Zeuzem, O. Lenz, M. Peeters, V. Sekar, and G. De Smedt. 2012.** Antiviral activity of TMC435 monotherapy in patients infected with HCV genotypes 2-6: TMC435-C202, a phase IIa, open-label study. *Journal of Hepatology*. **56**:1247-1253.

**Mori, S., S. Miyake, T. Kobe, T. Nakaya, S.D. Fuller, N. Kato, and K. Kaihatsu. 2008.** Enhanced anti-influenza A virus activity of (-)-epigallocatechin-3-O-gallate fatty acid monoester derivatives: effect of alkyl chain length. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **18**:4249-4252.

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

**Muir, A.J., M.L. Shiffman, A. Zaman, B. Yoffe, A. de la Torre, S. Flamm, S.C. Gordon, P. Marotta, J.M. Vierling, J.C. Lopez-Talavera, K. Byrnes-Blake, D. Fontana, J. Freeman, T. Gray, D. Hausman, N.N. Hunder, and E. Lawitz. 2010.** Phase 1b study of pegylated interferon lambda 1 with or without ribavirin in patients with chronic genotype 1 hepatitis C virus infection. *Hepatology*. **52**:822-832.

**Mullis, K.B., and F.A. Faloona. 1987.** Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*. **155**:335-350.

**Murphy, D.G., B. Willems, M. Deschênes, N. Hilzenrat, R. Mousseau, and S. Sabbah. 2007.** Use of sequence analysis of the NS5B region for routine genotyping of hepatitis C virus with reference to C/E1 and 5' untranslated region sequences. *Journal of Clinical Microbiology*. **45**:1102-1112.

**Murray, C.L., C.T. Jones, J. Tassello, and C.M. Rice. 2007.** Alanine scanning of the hepatitis C virus core protein reveals numerous residues essential for production of infectious virus. *Journal of Virology*. **81**:10220-10231.

**Müller, H.M., E. Pfaff, T. Goeser, B. Kallinowski, C. Solbach, and L. Theilmann. 1993.** Peripheral blood leukocytes serve as a possible extrahepatic site for hepatitis C virus replication. *Journal of General Virology*. **74**:669-676.

## N

**Nakai, K., T. Okamoto, T. Kimura-Someya, K. Ishii, C.K. Lim, H. Tani, E. Matsuo, T. Abe, Y. Mori, T. Suzuki, T. Miyamura, J.H. Nunberg, K. Moriishi, and Y. Matsuura. 2006.** Oligomerization of hepatitis C virus core protein is crucial for interaction with the cytoplasmic domain of E1 envelope protein. *Journal of Virology*. **80**:11265-11273.

**Nakane, H., and K. Ono. 1989.** Differential inhibition of HIV-reverse transcriptase and various DNA and RNA polymerases by some catechin derivatives. *Nucleic Acids Symposium Series*. **21**:115-116.

**Nakayama, M., K. Suzuki, M. Toda, S. Okubo, Y. Hara, and T. Shimamura. 1993.** Inhibition of the infectivity of influenza virus by tea polyphenols. *Antiviral Research*. **21**:289-299.

**Neddermann, P., M. Quintavalle, C. Di Pietro, A. Clementi, M. Cerretani, S. Altamura, L. Bartholomew, and R. De Francesco. 2004.** Reduction of hepatitis C virus NS5A hyperphosphorylation by selective inhibition of cellular kinases activates viral RNA replication in cell culture. *Journal of Virology*. **78**:13306-13314.

**Negro, F., and A. Alberti. 2011.** The global health burden of hepatitis C virus infection. *Liver International*. **31** (Suppl 2):1-3.

**Nelson, D.R., Y. Benhamou, W.-L. Chuang, E.J. Lawitz, M. Rodriguez-Torres, R. Flisiak, J.W.F. Rasenack, W. Kryczka, C.M. Lee, V.G. Bain, S. Pianko, K. Patel, P.W. Cronin, E. Pulkstenis, G.M. Subramanian, J.G. McHutchison, ACHIEVE-2/3 Study Team. 2010.** Albinterferon alfa-2b was not inferior to pegylated interferon- $\alpha$  in a randomized trial of patients with chronic hepatitis C virus genotype 2 or 3. *Gastroenterology*. **139**:1267-1276.

**Neumann, A.U., N.P. Lam, H. Dahari, D.R. Gretch, T.E. Wiley, T.J. Layden, and A.S. Perelson. 1998.** Hepatitis C viral dynamics *in vivo* and the antiviral efficacy of interferon- $\alpha$  therapy. *Science*. **282**:103-107.

**Neumann-Haefelin, C., H.E. Blum, F.V. Chisari, and R. Thimme. 2005.** T cell response in hepatitis C virus infection. *Journal of Clinical Virology*. **32**:75-85.

**Nguyen, H., S. Sankaran, and S. Dandekar. 2006.** Hepatitis C virus core protein induces expression of genes regulating immune evasion and anti-apoptosis in hepatocytes. *Virology*. **354**:58-68.

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

**Nolandt, O., V. Kern, H. Müller, E. Pfaff, L. Theilmann, R. Welker, and H.G. Kräusslich. 1997.** Analysis of hepatitis C virus core protein interaction domains. *Journal of General Virology*. **78**:1331-1340.

**Noppornpanth, S., T.X. Lien, Y. Poovorawan, S.L. Smits, A.D.M.E. Osterhaus, and B.L. Haagmans. 2006.** Identification of a naturally occurring recombinant genotype 2/6 hepatitis C virus. *Journal of Virology*. **80**:7569-7577.

## O

**Okamoto, K., Y. Mori, Y. Komoda, T. Okamoto, M. Okochi, M. Takeda, T. Suzuki, K. Moriishi, and Y. Matsuura. 2008.** Intramembrane processing by signal peptide peptidase regulates the membrane localization of hepatitis C virus core protein and viral propagation. *Journal of Virology*. **82**:8349-8361.

**Okamoto, T., Y. Nishimura, T. Ichimura, K. Suzuki, T. Miyamura, T. Suzuki, K. Moriishi, and Y. Matsuura. 2006.** Hepatitis C virus RNA replication is regulated by FKBP8 and Hsp90. *EMBO Journal*. **25**:5015-5025.

**Olenina, L.V., T.I. Kuzmina, B.N. Sobolev, T.E. Kuraeva, E.F. Kolesanova, and A.I. Archakov. 2005.** Identification of glycosaminoglycan-binding sites within hepatitis C virus envelope glycoprotein E2. *Journal of Viral Hepatitis*. **12**:584-593.

**Op De Beeck, A., R. Montserret, S. Duvet, L. Cocquerel, R. Cacan, B. Barberot, M. Le Maire, F. Penin, and J. Dubuisson. 2000.** The transmembrane domains of hepatitis C virus envelope glycoproteins E1 and E2 play a major role in heterodimerization. *Journal of Biological Chemistry*. **275**:31428-31437.

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

**Otto, G.A., and J.D. Puglisi. 2004.** The pathway of HCV IRES-mediated translation initiation. *Cell*. **119**:369-380.

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

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

**Owsianka, A.M., J.M. Timms, A.W. Tarr, R.J.P. Brown, T.P. Hickling, A. Szwejk, K. Bienkowska-Szewczyk, B.J. Thomson, A.H. Patel, and J.K. Ball. 2006.** Identification of conserved residues in the E2 envelope glycoprotein of the hepatitis C virus that are critical for CD81 binding. *Journal of Virology*. **80**:8695-8704.

## **P**

**Pachiadakis, I., G. Pollara, B.M. Chain, and N.V. Naoumov. 2005.** Is hepatitis C virus infection of dendritic cells a mechanism facilitating viral persistence? *Lancet Infectious Diseases*. **5**:296-304.

**Paeshuyse, J., A. Kaul, E. De Clercq, B. Rosenwirth, J.M. Dumont, P. Scalfaro, R. Bartenschlager, and J. Neyts. 2006.** The non-immunosuppressive cyclosporin DEBIO-025 is a potent inhibitor of hepatitis C virus replication *in vitro*. *Hepatology*. **43**:761-770.

**Pancholi, P., M. Perkus, N. Tricoche, Q. Liu, and A.M. Prince. 2003.** DNA immunization with hepatitis C virus (HCV) polycistronic genes or immunization by HCV DNA priming-recombinant canarypox virus boosting induces immune responses and protection from recombinant HCV-vaccinia virus infection in HLA-A2.1-transgenic mice. *Journal of Virology*. **77**:382-390.

**Pang, P.S., E. Jankowsky, P.J. Planet, and A.M. Pyle. 2002.** The hepatitis C viral NS3 protein is a processive DNA helicase with cofactor enhanced RNA unwinding. *EMBO Journal*. **21**:1168-1176.

**Passamonti, S., U. Vrhovsek, A. Vanzo, and F. Mattivi. 2003.** The stomach as a site for anthocyanins absorption from food. *FEBS Letters*. **544**:210-213.

- Pavlović, D., D.C.A. Neville, O. Argaud, B. Blumberg, R.A. Dwek, W.B. Fischer, and N. Zitzmann. 2003.** The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain iminosugar derivatives. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **100**:6104-6108.
- Pawlotsky, J.M. 2002.** Use and interpretation of virological tests for hepatitis C. *Hepatology*. **36 (Suppl 1)**:65-73.
- Pawlotsky, J.M., H. Dahari, A.U. Neumann, C. Hézode, G. Germanidis, I. Lonjon, L. Castera, and D. Dhumeaux. 2004.** Antiviral action of ribavirin in chronic hepatitis C. *Gastroenterology*. **126**:703-714.
- Penin, F., C. Combet, G. Germanidis, P.O. Frainais, G. Deléage, and J.M. Pawlotsky. 2001.** Conservation of the conformation and positive charges of hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein hypervariable region 1 points to a role in cell attachment. *Journal of Virology*. **75**:5703-5710.
- Penin, F., V. Brass, N. Appel, S. Ramboarina, R. Montserret, D. Ficheux, H.E. Blum, R. Bartenschlager, and D. Moradpour. 2004.** Structure and function of the membrane anchor domain of hepatitis C virus nonstructural protein 5A. *Journal of Biological Chemistry*. **279**:40835-40843.
- Pestka, J.M., M.B. Zeisel, E. Bläser, P. Schürmann, B. Bartosch, F.L. Cosset, A.H. Patel, H. Meisel, J. Baumert, S. Viazov, K. Rispeter, H.E. Blum, M. Roggendorf, and T.F. Baumert. 2007.** Rapid induction of virus-neutralizing antibodies and viral clearance in a single-source outbreak of hepatitis C. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **104**:6025-6030.
- Pécheur, E.I., D. Lavillette, F. Alcaras, J. Molle, Y.S. Boriskin, M. Roberts, F.L. Cosset, and S.J. Polyak. 2007.** Biochemical mechanism of hepatitis C virus inhibition by the broad-spectrum antiviral arbidol. *Biochemistry*. **46**:6050-6059.
- Pécheur, E.I., O. Diaz, J. Molle, V. Icard, P. Bonnafous, O. Lambert, and P. André. 2010.** Morphological characterization and fusion properties of triglyceride-rich lipoproteins obtained from cells transduced with hepatitis C virus glycoproteins. *Journal of Biological Chemistry*. **285**:25802-25811.
- Pflugheber, J., B. Fredericksen, R. Sumpter, C. Wang, F. Ware, D.L. Sodora, and M. Gale. 2002.** Regulation of PKR and IRF-1 during hepatitis C virus RNA replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **99**:4650-4655.
- Pietschmann, T., V. Lohmann, A. Kaul, N. Krieger, G. Rinck, G. Rutter, D. Strand, and R. Bartenschlager. 2002.** Persistent and transient replication of full-length hepatitis C virus genomes in cell culture. *Journal of Virology*. **76**:4008-4021.
- Pietschmann, T., A. Kaul, G. Koutsoudakis, A. Shavinskaya, S. Kallis, E. Steinmann, K. Abid, F. Negro, M. Dreux, F.L. Cosset, and R. Bartenschlager. 2006.** Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **103**:7408-7413.

- Pietschmann, T., M. Zayas, P. Meuleman, G. Long, N. Appel, G. Koutsoudakis, S. Kallis, G. Leroux-Roels, V. Lohmann, and R. Bartenschlager. 2009.** Production of infectious genotype 1b virus particles in cell culture and impairment by replication enhancing mutations. *PLoS Pathogens*. **5**:e1000475.
- Pileri, P., Y. Uematsu, S. Campagnoli, G. Galli, F. Falugi, R. Petracca, A.J. Weiner, M. Houghton, D. Rosa, and G. Grandi. 1998.** Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science*. **282**:938-941.
- Ploss, A., M.J. Evans, V.A. Gaysinskaya, M. Panis, H. You, Y.P. de Jong, and C.M. Rice. 2009.** Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature*. **457**:882-886.
- Ploss, A., and J. Dubuisson. 2012.** New advances in the molecular biology of hepatitis C virus infection: towards the identification of new treatment targets. *Gut*. **61 (Suppl 1)**:25–35.
- Poch, O., I. Sauvaget, M. Delarue, and N. Tordo. 1989.** Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *EMBO Journal*. **8**:3867-3874.
- Podevin, P., A. Carpentier, V. Pène, L. Aoudjehane, M. Carrière, S. Zaïdi, C. Hernandez, V. Calle, J.F. Méritet, O. Scatton, M. Dreux, F.L. Cosset, T. Wakita, R. Bartenschlager, S. Demignot, F. Conti, A.R. Rosenberg, and Y. Calmus. 2010.** Production of infectious hepatitis C virus in primary cultures of human adult hepatocytes. *Gastroenterology*. **139**:1355-1364.
- Pol, S.S., R.H.R. Ghalib, V.K.V. Rustgi, C.C. Martorell, G.T.G. Everson, H.A.H. Tatum, C.C. Hézode, J.K.J. Lim, J.P.J. Bronowicki, G.A.G. Abrams, N.N. Bräu, D.W.D. Morris, P.J.P. Thuluvath, R.W.R. Reindollar, P.D.P. Yin, U.U. Diva, R.R. Hindes, F.F. McPhee, D.D. Hernandez, M.M. Wind-Rotolo, E.A.E. Hughes, and S.S. Schnittman. 2012.** Daclatasvir for previously untreated chronic hepatitis C genotype-1 infection: a randomised, parallel-group, double-blind, placebo-controlled, dose-finding, phase 2a trial. *Lancet Infectious Diseases*. **12**:671-677.
- Polyak, S.J., K.S. Khabar, D.M. Paschal, H.J. Ezelle, G. Duverlie, G.N. Barber, D.E. Levy, N. Mukaida, and D.R. Gretch. 2001.** Hepatitis C virus nonstructural 5A protein induces interleukin-8, leading to partial inhibition of the interferon-induced antiviral response. *Journal of Virology*. **75**:6095-6106.
- Poordad, F., J. McCone, B.R. Bacon, S. Bruno, M.P. Manns, M.S. Sulkowski, I.M. Jacobson, K.R. Reddy, Z.D. Goodman, N. Boparai, M.J. DiNubile, V. Sniukiene, C.A. Brass, J.K. Albrecht, J.-P. Bronowicki, SPRINT-2 Investigators. 2011.** Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 infection. *New England Journal of Medicine*. **364**:1195-1206.
- Poordad, F., and D. Dieterich. 2012.** Treating hepatitis C: current standard of care and emerging direct-acting antiviral agents. *Journal of Viral Hepatitis*. **19**:449-464.
- Popescu, C.I., and J. Dubuisson. 2010.** Role of lipid metabolism in hepatitis C virus assembly and entry. *Biology of the Cell*. **102**:63-74.

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

**Popescu, C.I., Y. Rouillé, and J. Dubuisson. 2011b.** Hepatitis C virus assembly imaging. *Viruses*. **3**:2238-2254.

**Post, J.J., Y. Pan, A.J. Freeman, C.E. Harvey, P.A. White, P. Palladinetti, P.S. Haber, G. Marinos, M.H. Levy, J.M. Kaldor, K.A. Dolan, R.A. Ffrench, A.R. Lloyd, W.D. Rawlinson, Hepatitis C Incidence and Transmission in Prisons Study (HITS) Group. 2004.** Clearance of hepatitis C viremia associated with cellular immunity in the absence of seroconversion in the hepatitis C incidence and transmission in prisons study cohort. *Journal of Infectious Diseases*. **189**:1846-1855.

**Poynard, T., P. Marcellin, S.S. Lee, C. Niederau, G.S. Minuk, G. Ideo, V. Bain, J. Heathcote, S. Zeuzem, C. Trépo, and J. Albrecht. 1998.** Randomised trial of interferon alpha2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. International Hepatitis Interventional Therapy Group (IHIT). *Lancet*. **352**:1426-1432.

**Pöhlmann, S., J. Zhang, F. Baribaud, Z. Chen, G.J. Leslie, G. Lin, A. Granelli-Piperno, R.W. Doms, C.M. Rice, and J.A. McKeating. 2003.** Hepatitis C virus glycoproteins interact with DC-SIGN and DC-SIGNR. *Journal of Virology*. **77**:4070-4080.

## R

**Rakipov, N.G. 1987.** Biochimie Des Cultures Tropicales.

**Ralston, R., K. Thudium, K. Berger, C. Kuo, B. Gervase, J. Hall, M. Selby, G. Kuo, M. Houghton, and Q.L. Choo. 1993.** Characterization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia viruses. *Journal of Virology*. **67**:6753-6761.

**Rehermann, B. 2009.** Hepatitis C virus versus innate and adaptive immune responses: a tale of coevolution and coexistence. *Journal of Clinical Investigation*. **119**:1745-1754.

**Rhains, D., and L. Brissette. 2004.** The role of scavenger receptor class B type I (SR-BI) in lipid trafficking defining the rules for lipid traders. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. **36**:39-77.

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

**Roingeard, P., and C. Hourieux. 2008.** Hepatitis C virus core protein, lipid droplets and steatosis. *Journal of Viral Hepatitis*. **15**:157-164.

**Roohvand, F., P. Maillard, J.P. Lavergne, S. Boulant, M. Walic, U. Andréo, L. Goueslain, F. Helle, A. Mallet, J. McLauchlan, and A. Budkowska. 2009.** Initiation of hepatitis C virus infection requires the dynamic microtubule network: role of the viral nucleocapsid protein. *Journal of Biological Chemistry*. **284**:13778-13791.

**Roohvand, F., and N. Kossari. 2012.** Advances in hepatitis C virus vaccines, part two: advances in hepatitis C virus vaccine formulations and modalities. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. **22**:391-415.

**Rosen, H.R., C. Miner, A.W. Sasaki, D.M. Lewinsohn, A.J. Conrad, A. Bakke, H.G. Bower, and D.J. Hinrichs. 2002.** Frequencies of HCV-specific effector CD4+ T cells by flow cytometry: Correlation with clinical disease stages. *Hepatology*. **35**:190-198.

**Roudot-Thoraval, F. 2002.** Epidémiologie de l'hépatite C. *Médecine Sciences*. **18**:315-324.

**Rouillé, Y., F. Helle, D. Delgrange, P. Roingeard, C. Voisset, E. Blanchard, S. Belouzard, J. McKeating, A.H. Patel, G. Maertens, T. Wakita, C. Wychowski, and J. Dubuisson. 2006.** Subcellular localization of hepatitis C virus structural proteins in a cell culture system that efficiently replicates the virus. *Journal of Virology*. **80**:2832-2841.

**Roy, K., G. Hay, R. Andragetti, A. Taylor, D. Goldberg, and L. Wiessing. 2002.** Monitoring hepatitis C virus infection among injecting drug users in the European Union: a review of the literature. *Epidemiology and Infection*. **129**:577-586.

**Rumin, S., P. Berthillon, E. Tanaka, K. Kiyosawa, M.A. Trabaud, T. Bizollon, C. Gouillat, P. Gripon, C. Guguen-Guillouzo, G. Inchauspé, and C. Trépo. 1999.** Dynamic analysis of hepatitis C virus replication and quasispecies selection in long-term cultures of adult human hepatocytes infected *in vitro*. *Journal of General Virology*. **80**:3007-3018.

## S

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

**Saito, H., P. Dhanasekaran, D. Nguyen, F. Baldwin, K.H. Weisgraber, S. Wehrli, M.C. Phillips, and S. Lund-Katz. 2003.** Characterization of the heparin binding sites in human apolipoprotein E. *Journal of Biological Chemistry*. **278**:14782-14787.

**Saito, T., D.M. Owen, F. Jiang, J. Marcotrigiano, and M. Gale. 2008.** Innate immunity induced by composition-dependent RIG-I recognition of hepatitis C virus RNA. *Nature*. **454**:523-527.

**Saitou, M., Y. Ando-Akatsuka, M. Itoh, M. Furuse, J. Inazawa, K. Fujimoto, and S. Tsukita. 1997.** Mammalian occludin in epithelial cells: its expression and subcellular distribution. *European Journal of Cell Biology*. **73**:222-231.

- Sakai, A., M.S. Claire, K. Faulk, S. Govindarajan, S.U. Emerson, R.H. Purcell, and J. Bukh. 2003.** The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **100**:11646-11651.
- Salloum, S., and A.W. Tai. 2012.** Treating hepatitis C infection by targeting the host. *Translational Research*. **159**:421-429.
- Sandrin, V., P. Boulanger, F. Penin, C. Granier, F.L. Cosset, and B. Bartosch. 2005.** Assembly of functional hepatitis C virus glycoproteins on infectious pseudoparticles occurs intracellularly and requires concomitant incorporation of E1 and E2 glycoproteins. *Journal of General Virology*. **86**:3189-3199.
- Santolini, E., G. Migliaccio, and N. La Monica. 1994.** Biosynthesis and biochemical properties of the hepatitis C virus core protein. *Journal of Virology*. **68**:3631-3641.
- Santolini, E., L. Pacini, C. Fipaldini, G. Migliaccio, and N. Monica. 1995.** The NS2 protein of hepatitis C virus is a transmembrane polypeptide. *Journal of Virology*. **69**:7461-7471.
- Sarasin-Filipowicz, M., E.J. Oakeley, F.H.T. Duong, V. Christen, L. Terracciano, W. Filipowicz, and M.H. Heim. 2008.** Interferon signaling and treatment outcome in chronic hepatitis C. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **105**:7034-7039.
- Sarrazin, C., C. Hézode, S. Zeuzem, and J.-M. Pawlotsky. 2012.** Antiviral strategies in hepatitis C virus infection. *Journal of Hepatology*. **56 (Suppl 1)**:88-100.
- Saunier, B., M. Triyatni, L. Ulianich, P. Maruvada, P. Yen, and L.D. Kohn. 2003.** Role of the asialoglycoprotein receptor in binding and entry of hepatitis C virus structural proteins in cultured human hepatocytes. *Journal of Virology*. **77**:546-559.
- Scapa, E.F., K. Kanno, and D.E. Cohen. 2007.** Lipoprotein metabolism. *The Textbook of Hepatology: From Basic Science to Clinical Practice*. 3rd ed. Oxford, UK: Blackwell. 133-141.
- Scarselli, E., H. Ansuini, R. Cerino, R.M. Roccasecca, S. Acali, G. Filocamo, C. Traboni, A. Nicosia, R. Cortese, and A. Vitelli. 2002.** The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO Journal*. **21**:5017-5025.
- Schang, L.M. HCV 2012.** New antiviral therapies and clinical research session. Novel HCV binding and fusion assays identify the specific steps inhibited by small molecule inhibitors of HCV entry.
- Scheel, T.K.H., J.M. Gottwein, T.B. Jensen, J.C. Prentoe, A.M. Hoegh, H.J. Alter, J. Eugen-Olsen, and J. Bukh. 2008.** Development of JFH1-based cell culture systems for hepatitis C virus genotype 4a and evidence for cross-genotype neutralization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **105**:997-1002.
- Schregel, V., S. Jacobi, F. Penin, and N. Tautz. 2009.** Hepatitis C virus NS2 is a protease stimulated by cofactor domains in NS3. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **106**:5342-5347.

- Seipp, S., H.M. Mueller, E. Pfaff, W. Stremmel, L. Theilmann, and T. Goeser. 1997.** Establishment of persistent hepatitis C virus infection and replication *in vitro*. *Journal of General Virology*. **78**:2467-2476.
- Serebrov, V., and A.M. Pyle. 2004.** Periodic cycles of RNA unwinding and pausing by hepatitis C virus NS3 helicase. *Nature*. **430**:476-480.
- Shavinskaya, A., S. Boulant, F. Penin, J. McLauchlan, and R. Bartenschlager. 2007.** The lipid droplet binding domain of hepatitis C virus core protein is a major determinant for efficient virus assembly. *Journal of Biological Chemistry*. **282**:37158-37169.
- Shepherd, F.A., J. Rodrigues Pereira, T. Ciuleanu, E.H. Tan, V. Hirsh, S. Thongprasert, D. Campos, S. Maoleekoonpiroj, M. Smylie, R. Martins, M. van Kooten, M. Dediu, B. Findlay, D. Tu, D. Johnston, A. Bezjak, G. Clark, P. Santabarbara, L. Seymour, National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. 2005.** Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *New England Journal of Medicine*. **353**:123-132.
- Sherman, K.E., S.L. Flamm, N.H. Afdhal, D.R. Nelson, M.S. Sulkowski, G.T. Everson, M.W. Fried, M. Adler, H.W. Reesink, M. Martin, A.J. Sankoh, N. Adda, R.S. Kauffman, S. George, C.I. Wright, F. Poordad, ILLUMINATE Study Team. 2011.** Response-guided telaprevir combination treatment for hepatitis C virus infection. *New England Journal of Medicine*. **365**:1014-1024.
- Shiffman, M.L., F. Suter, B.R. Bacon, D. Nelson, H. Harley, R. Solá, S.D. Shafran, K. Barange, A. Lin, A. Soman, S. Zeuzem, ACCELERATE Investigators. 2007.** Peginterferon alfa-2a and ribavirin for 16 or 24 weeks in HCV genotype 2 or 3. *New England Journal of Medicine*. **357**:124-134.
- Shim, J.H., G. Larson, J.Z. Wu, and Z. Hong. 2002.** Selection of 3'-template bases and initiating nucleotides by hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA polymerase. *Journal of Virology*. **76**:7030-7039.
- Shimakami, T., M. Hijikata, H. Luo, Y.Y. Ma, S. Kaneko, K. Shimotohno, and S. Murakami. 2004.** Effect of interaction between hepatitis C virus NS5A and NS5B on hepatitis C virus RNA replication with the hepatitis C virus replicon. *Journal of Virology*. **78**:2738-2748.
- Shimizu, Y.K., A. Iwamoto, M. Hijikata, R.H. Purcell, and H. Yoshikura. 1992.** Evidence for *in vitro* replication of hepatitis C virus genome in a human T-cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **89**:5477-5481.
- Shirley, B.W. 1996.** Flavonoid biosynthesis: "new" functions for an "old" pathway. *Trends in Plant Science*. **1**:377-382.
- Simmonds, P., E.C. Holmes, T.A. Cha, S.W. Chan, F. McOmish, B. Irvine, E. Beall, P.L. Yap, J. Kolberg, and M.S. Urdea. 1993.** Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *Journal of General Virology*. **74**:2391-2399.

- Simmonds, P., J. Bukh, C. Combet, G. Deléage, N. Enomoto, S. Feinstone, P. Halfon, G. Inchauspé, C. Kuiken, G. Maertens, M. Mizokami, D.G. Murphy, H. Okamoto, J.M. Pawlotsky, F. Penin, E. Sablon, T. Shin-I, L.J. Stuyver, H.J. Thiel, S. Viazov, A.J. Weiner, and A. Widell. 2005.** Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*. **42**:962-973.
- Slater-Handshy, T., D.A. Droll, X. Fan, A.M. Di Bisceglie, and T.J. Chambers. 2004.** HCV E2 glycoprotein: mutagenesis of N-linked glycosylation sites and its effects on E2 expression and processing. *Virology*. **319**:36-48.
- Song, Y., P. Friebe, E. Tzima, C. Jünemann, R. Bartenschlager, and M. Niepmann. 2006.** The hepatitis C virus RNA 3'-untranslated region strongly enhances translation directed by the internal ribosome entry site. *Journal of Virology*. **80**:11579-11588.
- Spillmann, D. 2001.** Heparan sulfate: anchor for viral intruders? *Biochimie*. **83**:811-817.
- Stamataki, Z., C. Shannon-Lowe, J. Shaw, D. Mutimer, A.B. Rickinson, J. Gordon, D.H. Adams, P. Balfe, and J.A. McKeating. 2009.** Hepatitis C virus association with peripheral blood B lymphocytes potentiates viral infection of liver-derived hepatoma cells. *Blood*. **113**:585-593.
- Stapleford, K.A., and B.D. Lindenbach. 2011.** Hepatitis C virus NS2 coordinates virus particle assembly through physical interactions with the E1-E2 glycoprotein and NS3-NS4A enzyme complexes. *Journal of Virology*. **85**:1706-1717.
- Steinmann, E., F. Penin, S. Kallis, A.H. Patel, R. Bartenschlager, and T. Pietschmann. 2007.** Hepatitis C virus p7 protein is crucial for assembly and release of infectious virions. *PLoS Pathogens*. **3**:e103.
- Strickland, G.T. 2006.** Liver disease in Egypt: hepatitis C superseded schistosomiasis as a result of iatrogenic and biological factors. *Hepatology*. **43**:915-922.
- Strickland, G.T., S.S. El-Kamary, P. Klenerman, and A. Nicosia. 2008.** Hepatitis C vaccine: supply and demand. *Lancet Infectious Diseases*. **8**:379-386.
- Sulkowski, M.S., E. Ceasu, T. Asselah, F.A. Caruntu, J. Lalezari, P. Ferenci, A. Streinu-Cercel, H. Fainboim, H. Tanno, and L. Preotescu. 2011.** SILEN-C1: sustained virologic response (SVR) and safety of BI201335 combined with PEG-interferon alfa-2A and ribavirin (P/R) in treatment-naïve patients with chronic genotype 1 HCV infection. *Journal of Hepatology*. **54 (Suppl 1)**:27.
- Summa, V.V., S.W.S. Ludmerer, J.A.J. McCauley, C.C. Fandozzi, C.C. Burlein, G.G. Claudio, P.J.P. Coleman, J.M.J. Dimuzio, M.M. Ferrara, M.M. Di Filippo, A.T.A. Gates, D.J.D. Graham, S.S. Harper, D.J.D. Hazuda, C.C. McHale, E.E. Monteagudo, V.V. Pucci, M.M. Rowley, M.T.M. Rudd, A.A. Soriano, M.W.M. Stahlhut, J.P.J. Vacca, D.B.D. Olsen, N.J.N. Liverton, and S.S.S. Carroll. 2012.** MK-5172, a Selective Inhibitor of Hepatitis C Virus NS3/4a Protease with Broad Activity across Genotypes and Resistant Variants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **56**:4161-4167.
- Sumpter, R., Y.M. Loo, E. Foy, K. Li, M. Yoneyama, T. Fujita, S.M. Lemon, and M. Gale. 2005.** Regulating intracellular antiviral defense and permissiveness to hepatitis C virus RNA replication through a cellular RNA helicase, RIG-I. *Journal of Virology*. **79**:2689-2699.

**Suppiah, V., M. Moldovan, G. Ahlenstiel, T. Berg, M. Weltman, M.L. Abate, M. Bassendine, U. Spengler, G.J. Dore, E. Powell, S. Riordan, D. Sheridan, A. Smedile, V. Fragomeli, T. Müller, M. Bahlo, G.J. Stewart, D.R. Booth, and J. George. 2009.** IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. *Nature Genetics*. **41**:1100-1104.

**Surh, Y.J. 2003.** Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nature Reviews. Cancer*. **3**:768-780.

**Svitkin, Y.V., A. Pause, M. Lopez-Lastra, S. Perreault, and N. Sonenberg. 2005.** Complete translation of the hepatitis C virus genome *in vitro*: membranes play a critical role in the maturation of all virus proteins except for NS3. *Journal of Virology*. **79**:6868-6881.

**Syder, A.J., H. Lee, M.B. Zeisel, J. Grove, E. Soulier, J. Macdonald, S. Chow, J. Chang, T.F. Baumert, J.A. McKeating, J. McKelvy, and F. Wong-Staal. 2011.** Small molecule scavenger receptor BI antagonists are potent HCV entry inhibitors. *Journal of Hepatology*. **54**:48-55.

## T

**Tachibana, H., K. Koga, Y. Fujimura, and K. Yamada. 2004.** A receptor for green tea polyphenol EGCG. *Nature Structural & Molecular Biology*. **11**:380-381.

**Tachibana, H. 2011.** Green tea polyphenol sensing. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences*. **87**:66-80.

**Takaki, A., M. Wiese, G. Maertens, E. Depla, U. Seifert, A. Liebetrau, J.L. Miller, M.P. Manns, and B. Rehermann. 2000.** Cellular immune responses persist and humoral responses decrease two decades after recovery from a single-source outbreak of hepatitis C. *Nature Medicine*. **6**:578-582.

**Talavéra, S., C. Felgines, O. Texier, C. Besson, J.L. Lamaison, and C. Rémésy. 2003.** Anthocyanins are efficiently absorbed from the stomach in anesthetized rats. *Journal of Nutrition*. **133**:4178-4182.

**Talavéra, S., C. Felgines, O. Texier, C. Besson, A. Gil-Izquierdo, J.-L. Lamaison, and C. Rémésy. 2005.** Anthocyanin metabolism in rats and their distribution to digestive area, kidney, and brain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **53**:3902-3908.

**Tam, R.C., B. Pai, J. Bard, C. Lim, D.R. Averett, U.T. Phan, and T. Milovanovic. 1999.** Ribavirin polarizes human T cell responses towards a type 1 cytokine profile. *Journal of Hepatology*. **30**:376-382.

**Tanaka, T., N. Kato, M.J. Cho, K. Sugiyama, and K. Shimotohno. 1996.** Structure of the 3' terminus of the hepatitis C virus genome. *Journal of Virology*. **70**:3307-3312.

- Tanaka, Y., N. Nishida, M. Sugiyama, M. Kurosaki, K. Matsuura, N. Sakamoto, M. Nakagawa, M. Korenaga, K. Hino, S. Hige, Y. Ito, E. Mita, E. Tanaka, S. Mochida, Y. Murawaki, M. Honda, A. Sakai, Y. Hiasa, S. Nishiguchi, A. Koike, I. Sakaida, M. Imamura, K. Ito, K. Yano, N. Masaki, F. Sugauchi, N. Izumi, K. Tokunaga, and M. Mizokami. 2009.** Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nature Genetics*. **41**:1105-1109.
- Tarr, A.W., A.M. Owsianka, J.M. Timms, C.P. McClure, R.J.P. Brown, T.P. Hickling, T. Pietschmann, R. Bartenschlager, A.H. Patel, and J.K. Ball. 2006.** Characterization of the hepatitis C virus E2 epitope defined by the broadly neutralizing monoclonal antibody AP33. *Hepatology*. **43**:592-601.
- Tellinghuisen, T.L., J. Marcotrigiano, A.E. Gorbalenya, and C.M. Rice. 2004.** The NS5A protein of hepatitis C virus is a zinc metalloprotein. *Journal of Biological Chemistry*. **279**:48576-48587.
- Tellinghuisen, T.L., J. Marcotrigiano, and C.M. Rice. 2005.** Structure of the zinc-binding domain of an essential component of the hepatitis C virus replicase. *Nature*. **435**:374-379.
- Tellinghuisen, T.L., K.L. Foss, J.C. Treadaway, and C.M. Rice. 2008.** Identification of residues required for RNA replication in domains II and III of the hepatitis C virus NS5A protein. *Journal of Virology*. **82**:1073-1083.
- Tews, B.A., C.I. Popescu, and J. Dubuisson. 2010.** Last stop before exit-hepatitis C assembly and release as antiviral drug targets. *Viruses*. **2**:1782-1803.
- Thimme, R., D. Oldach, K.M. Chang, C. Steiger, S.C. Ray, and F.V. Chisari. 2001.** Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *Journal of Experimental Medicine*. **194**:1395-1406.
- Thomas, D.L., C.L. Thio, M.P. Martin, Y. Qi, D. Ge, C. O'Huigin, J. Kidd, K. Kidd, S.I. Khakoo, G. Alexander, J.J. Goedert, G.D. Kirk, S.M. Donfield, H.R. Rosen, L.H. Tobler, M.P. Busch, J.G. McHutchison, D.B. Goldstein, and M. Carrington. 2009.** Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature*. **461**:798-801.
- Thomas, E., J.J. Feld, Q. Li, Z. Hu, M.W. Fried, and T.J. Liang. 2011.** Ribavirin potentiates interferon action by augmenting interferon-stimulated gene induction in hepatitis C virus cell culture models. *Hepatology*. **53**:32-41.
- Thomssen, R., S. Bonk, and A. Thiele. 1993.** Density heterogeneities of hepatitis C virus in human sera due to the binding of beta-lipoproteins and immunoglobulins. *Medical Microbiology and Immunology*. **182**:329-334.
- Timpe, J.M., Z. Stamataki, A. Jennings, K. Hu, M.J. Farquhar, H.J. Harris, A. Schwarz, I. Desombere, G.L. Roels, P. Balfe, and J.A. McKeating. 2008.** Hepatitis C virus cell-cell transmission in hepatoma cells in the presence of neutralizing antibodies. *Hepatology*. **47**:17-24.
- Tobler, L.H., and M.P. Busch. 1997.** History of posttransfusion hepatitis. *Clinical Chemistry*. **43**:1487-1493.

**Touzet, S., L. Kraemer, C. Colin, P. Pradat, D. Lanoir, F. Bailly, R.C. Coppola, S. Sauleda, M.R. Thursz, H. Tillmann, A. Alberti, J.H. Braconier, J.I. Esteban, S.J. Hadziyannis, M.P. Manns, G. Saracco, H.C. Thomas, and C. Trépo. 2000.** Epidemiology of hepatitis C virus infection in seven European Union countries: a critical analysis of the literature. HENCORE Group. (Hepatitis C European Network for Co-operative Research. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*. **12**:667-678.

**Trestard, A., Y. Bacq, L. Buzelay, F. Dubois, F. Barin, A. Goudeau, and P. Roingeard. 1998.** Ultrastructural and physicochemical characterization of the hepatitis C virus recovered from the serum of an agammaglobulinemic patient. *Archives of Virology*. **143**:2241-2245.

**Tsukita, S., M. Furuse, and M. Itoh. 2001.** Multifunctional strands in tight junctions. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. **2**:285-293.

**Tu, H., L. Gao, S.T. Shi, D.R. Taylor, T. Yang, A.K. Mircheff, Y. Wen, A.E. Gorbalenya, S.B. Hwang, and M.M. Lai. 1999.** Hepatitis C virus RNA polymerase and NS5A complex with a SNARE-like protein. *Virology*. **263**:30-41.

U

**Ujino, S., S. Yamaguchi, K. Shimotohno, and H. Takaku. 2009.** Heat-shock protein 90 is essential for stabilization of the hepatitis C virus nonstructural protein NS3. *Journal of Biological Chemistry*. **284**:6841-6846.

**Ullmann, U., J. Haller, J.P. Decourt, N. Girault, J. Girault, A.S. Richard-Caudron, B. Pineau, and P. Weber. 2003.** A single ascending dose study of epigallocatechin gallate in healthy volunteers. *Journal of International Medical Research*. **31**:88-101.

V

**Van Amelsvoort, J.M., K.H. Van Hof, J.N. Mathot, T.P. Mulder, A. Wiersma, and L.B. Tjiburg. 2001.** Plasma concentrations of individual tea catechins after a single oral dose in humans. *Xenobiotica*. **31**:891-901.

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

**Vanwolleghem, T., L. Libbrecht, B.E. Hansen, I. Desombere, T. Roskams, P. Meuleman, and G. Leroux-Roels. 2010.** Factors determining successful engraftment of hepatocytes and susceptibility to hepatitis B and C virus infection in uPA-SCID mice. *Journal of Hepatology*. **53**:468-476.

**Vaquer, P., R. Canet, A. Llompарт, J. Riera, A. Obrador, and J. Gaya. 1994.** Histological evolution of chronic hepatitis C. Factors related to progression. *Liver*. **14**:265-269.

**Varki, A., R.D. Cummings, J.D. Esko, H.H. Freeze, P. Stanley, C.R. Bertozzi, G.W. Hart, M.E. Etzler, J.D. Esko, K. Kimata, and U. Lindahl. 2009.** Proteoglycans and Sulfated Glycosaminoglycans. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY).

**Vassilaki, N., P. Friebe, P. Meuleman, S. Kallis, A. Kaul, G. Paranhos-Baccala, G. Leroux-Roels, P. Mavromara, and R. Bartenschlager. 2008.** Role of the hepatitis C virus core +1 open reading frame and core cis-acting RNA elements in viral RNA translation and replication. *Journal of Virology*. **82**:11503-11515.

**Venkatraman, S., S.L. Bogen, A. Arasappan, F. Bennett, K. Chen, E. Jao, Y.T. Liu, R. Lovey, S. Hendrata, Y. Huang, W. Pan, T. Parekh, P. Pinto, V. Popov, R. Pike, S. Ruan, B. Santhanam, B. Vibulbhan, W. Wu, W. Yang, J. Kong, X. Liang, J. Wong, R. Liu, N. Butkiewicz, R. Chase, A. Hart, S. Agrawal, P. Ingravallo, J. Pichardo, R. Kong, B. Baroudy, B. Malcolm, Z. Guo, A. Prongay, V. Madison, L. Broske, X. Cui, K.C. Cheng, Y. Hsieh, J.M. Brisson, D. Prelusky, W. Korfmacher, R. White, S. Bogdanowich-Knipp, A. Pavlovsky, P. Bradley, A.K. Saksena, A. Ganguly, J. Piwinski, V. Girijavallabhan, and F.G. Njoroge. 2006.** Discovery of (1R,5S)-N-[3-Amino-1-(cyclobutylmethyl)-2,3-dioxopropyl]-3-[2(S)-[[[(1,1-dimethylethyl)amino]carbonyl]amino]-3, 3-dimethyl-1-oxobutyl]-6,6-dimethyl-3-azabicyclo[3.1.0]hexan-2(S)-carboxamide (SCH503034), a Selective, Potent, Orally Bioavailable Hepatitis C Virus NS3 Protease Inhibitor: A Potential Therapeutic Agent for the Treatment of Hepatitis C Infection. *Journal of Medicinal Chemistry*. **49**:6074-6086.

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

**Vo, N.V., K.C. Young, and M.M.C. Lai. 2003.** Mutagenic and inhibitory effects of ribavirin on hepatitis C virus RNA polymerase. *Biochemistry*. **42**:10462-10471.

**von Hahn, T., B.D. Lindenbach, A. Boullier, O. Quehenberger, M. Paulson, C.M. Rice, and J.A. McKeating. 2006.** Oxidized low-density lipoprotein inhibits hepatitis C virus cell entry in human hepatoma cells. *Hepatology*. **43**:932-942.

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

**W**

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

**Walker, C.M. 1997.** Comparative features of hepatitis C virus infection in humans and chimpanzees. *Springer Seminars in Immunopathology*. **19**:85-98.

**Walters, K.A., A.J. Syder, S.L. Lederer, D.L. Diamond, B. Paeper, C.M. Rice, and M.G. Katze. 2009.** Genomic analysis reveals a potential role for cell cycle perturbation in HCV-mediated apoptosis of cultured hepatocytes. *PLoS Pathogens*. **5**:e1000269.

**Wang, C., S.Y. Le, N. Ali, and A. Siddiqui. 1995.** An RNA pseudoknot is an essential structural element of the internal ribosome entry site located within the hepatitis C virus 5' noncoding region. *RNA*. **1**:526-537.

- Wang, N., Y. Liang, S. Devaraj, J. Wang, S.M. Lemon, and K. Li. 2009.** Toll-like receptor 3 mediates establishment of an antiviral state against hepatitis C virus in hepatoma cells. *Journal of Virology*. **83**:9824-9834.
- Wang, Q.M., M.A. Hockman, K. Staschke, R.B. Johnson, K.A. Case, J. Lu, S. Parsons, F. Zhang, R. Rathnachalam, K. Kirkegaard, and J.M. Colacino. 2002.** Oligomerization and cooperative RNA synthesis activity of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *Journal of Virology*. **76**:3865-3872.
- Wang, R., W. Zhou, and X. Jiang. 2008.** Reaction kinetics of degradation and epimerization of epigallocatechin gallate (EGCG) in aqueous system over a wide temperature range. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **56**:2694-2701.
- Wang, Y., Z.Y. Keck, and S.K.H. Fong. 2011.** Neutralizing antibody response to hepatitis C virus. *Viruses*. **3**:2127-2145.
- Ward, S., G. Lauer, R. Isba, B. Walker, and P. Klenerman. 2002.** Cellular immune responses against hepatitis C virus: the evidence base 2002. *Clinical and Experimental Immunology*. **128**:195-203.
- Wartelle-Bladou, C., G. Le Folgoc, M. Bourlière, and L. Lecomte. 2012.** Hepatitis C therapy in non-genotype 1 patients: the near future. *Journal of Viral Hepatitis*. **19**:525-536.
- Weber, J.M., A. Ruzindana-Umunyana, L. Imbeault, and S. Sircar. 2003.** Inhibition of adenovirus infection and adenain by green tea catechins. *Antiviral Research*. **58**:167-173.
- Wedemeyer, H., E. Schuller, V. Schlaphoff, R.E. Stauber, J. Wiegand, I. Schiefke, C. Firbas, B. Jilma, M. Thursz, S. Zeuzem, W.P. Hofmann, H. Hinrichsen, E. Tauber, M.P. Manns, and C.S. Klade. 2009.** Therapeutic vaccine IC41 as late add-on to standard treatment in patients with chronic hepatitis C. *Vaccine*. **27**:5142-5151.
- Weinglass, A.B., M. Kohler, U. Schulte, J. Liu, E.O. Nketiah, A. Thomas, W. Schmalhofer, B. Williams, W. Bildl, D.R. McMasters, K. Dai, L. Beers, M.E. McCann, G.J. Kaczorowski, and M.L. Garcia. 2008.** Extracellular loop C of NPC1L1 is important for binding to ezetimibe. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **105**:11140-11145.
- Witkowski, J.T., R.K. Robins, R.W. Sidwell, and L.N. Simon. 1972.** Design, synthesis, and broad spectrum antiviral activity of 1-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide and related nucleosides. *Journal of Medicinal Chemistry*. **15**:1150-1154.
- Witteveldt, J., M.J. Evans, J. Bitzegeio, G. Koutsoudakis, A.M. Owsianka, A.G.N. Angus, Z.Y. Keck, S.K.H. Fong, T. Pietschmann, C.M. Rice, and A.H. Patel. 2009.** CD81 is dispensable for hepatitis C virus cell-to-cell transmission in hepatoma cells. *Journal of General Virology*. **90**:48-58.
- Wolk, B., D. Sansonno, H.G. Kräusslich, F. Dammacco, C.M. Rice, H.E. Blum, and D. Moradpour. 2000.** Subcellular localization, stability, and trans-cleavage competence of the hepatitis C virus NS3-NS4A complex expressed in tetracycline-regulated cell lines. *Journal of Virology*. **74**:2293-2304.

**X**

**Xu, J., J. Wang, F. Deng, Z. Hu, and H. Wang. 2008.** Green tea extract and its major component epigallocatechin gallate inhibits hepatitis B virus *in vitro*. *Antiviral Research*. **78**:242-249.

**Xu, Z., J. Choi, T.S. Yen, W. Lu, A. Strohecker, S. Govindarajan, D. Chien, M.J. Selby, and J. Ou. 2001.** Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift. *EMBO Journal*. **20**:3840-3848.

**Y**

**Yamaga, A.K., and J.H. Ou. 2002.** Membrane topology of the hepatitis C virus NS2 protein. *Journal of Biological Chemistry*. **277**:33228-33234.

**Yamaguchi, K., M. Honda, H. Ikigai, Y. Hara, and T. Shimamura. 2002.** Inhibitory effects of (-)-epigallocatechin gallate on the life cycle of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). *Antiviral Research*. **53**:19-34.

**Yang, C.S., L. Chen, M.J. Lee, D. Balentine, M.C. Kuo, and S.P. Schantz. 1998.** Blood and urine levels of tea catechins after ingestion of different amounts of green tea by human volunteers. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. **7**:351-354.

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

**Yano, M., H. Kumada, M. Kage, K. Ikeda, K. Shimamatsu, O. Inoue, E. Hashimoto, J.H. Lefkowitz, J. Ludwig, and K. Okuda. 1996.** The long-term pathological evolution of chronic hepatitis C. *Hepatology*. **23**:1334-1340.

**Yao, L., N. Caffin, B. D'arcy, Y. Jiang, J. Shi, R. Singanusong, X. Liu, N. Datta, Y. Kakuda, and Y. Xu. 2005.** Seasonal variations of phenolic compounds in Australia-grown tea (*Camellia sinensis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **53**:6477-6483.

**Yao, N., T. Hesson, M. Cable, Z. Hong, A.D. Kwong, H.V. Le, and P.C. Weber. 1997.** Structure of the hepatitis C virus RNA helicase domain. *Nature Structural Biology*. **4**:463-467.

**Yao, N., P. Reichert, S.S. Taremi, W.W. Prosser, and P.C. Weber. 1999.** Molecular views of viral polyprotein processing revealed by the crystal structure of the hepatitis C virus bifunctional protease-helicase. *Structure*. **7**:1353-1363.

**Yi, M., R.A. Villanueva, D.L. Thomas, T. Wakita, and S.M. Lemon. 2006.** Production of infectious genotype 1a hepatitis C virus (Hutchinson strain) in cultured human hepatoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **103**:2310-2315.

**Yi, M., Y. Ma, J. Yates, and S.M. Lemon. 2007.** Compensatory mutations in E1, p7, NS2, and NS3 enhance yields of cell culture-infectious intergenotypic chimeric hepatitis C virus. *Journal of Virology*. **81**:629-638.

- Yi, M., and S.M. Lemon. 2009.** Genotype 1a HCV (H77S) infection system. *Methods in Molecular Biology*. **510**:337-346.
- Yi, M., Y. Ma, J. Yates, and S.M. Lemon. 2009.** Trans-complementation of an NS2 defect in a late step in hepatitis C virus (HCV) particle assembly and maturation. *PLoS Pathogens*. **5**:e1000403.
- Yi, M.K., and S.M. Lemon. 2003.** 3' nontranslated RNA signals required for replication of hepatitis C virus RNA. *Journal of Virology*. **77**:3557-3568.
- Yin, Z., E.C. Henry, and T.A. Gasiewicz. 2009.** (-)-Epigallocatechin-3-gallate is a novel Hsp90 inhibitor. *Biochemistry*. **48**:336-345.
- Yoon, E.J., and K.Q. Hu. 2006.** Hepatitis C virus (HCV) infection and hepatic steatosis. *International Journal of Medical Sciences*. **3**:53-56.
- Yoon, J.C., M. Shiina, G. Ahlenstiel, and B. Rehermann. 2009.** Natural killer cell function is intact after direct exposure to infectious hepatitis C virions. *Hepatology*. **49**:12-21.
- Youn, J.W., Y.W. Hu, N. Tricoche, W. Pfahler, M.T. Shata, M. Dreux, F.L. Cosset, A. Folgori, D.H. Lee, B. Brotman, and A.M. Prince. 2008.** Evidence for protection against chronic hepatitis C virus infection in chimpanzees by immunization with replicating recombinant vaccinia virus. *Journal of Virology*. **82**:10896-10905.
- Yu, G.Y., K.J. Lee, L. Gao, and M.M.C. Lai. 2006.** Palmitoylation and polymerization of hepatitis C virus NS4B protein. *Journal of Virology*. **80**:6013-6023.
- Z**
- Zahn, A., and J.P. Allain. 2005.** Hepatitis C virus and hepatitis B virus bind to heparin: purification of largely IgG-free virions from infected plasma by heparin chromatography. *Journal of General Virology*. **86**:677-685.
- Zein, N.N. 2000.** Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *Clinical Microbiology Reviews*. **13**:223-235.
- Zeuzem, S. 2008.** Interferon-based therapy for chronic hepatitis C: current and future perspectives. *Nature Clinical Practice. Gastroenterology & Hepatology*. **5**:610-622.
- Zeuzem, S., E.M. Yoshida, Y. Benhamou, S. Pianko, V.G. Bain, D. Shouval, R. Flisiak, V. Rehak, M. Grigorescu, K. Kaita, P.W. Cronin, E. Pulkstenis, G.M. Subramanian, and J.G. McHutchison. 2008.** Albinterferon alfa-2b dosed every two or four weeks in interferon-naïve patients with genotype 1 chronic hepatitis C. *Hepatology*. **48**:407-417.
- Zeuzem, S., S. Arora, B. Bacon, T. Box, and M. Charlton. 2011.** Pegylated Interferon-lambda (PegIFN- $\lambda$ ) shows superior viral response with improved safety and tolerability versus PegIFN $\alpha$ -2a in HCV patients (G1/2/3/4): EMERGE Phase IIb Through Week 12. *Journal of Hepatology*. **54 (Suppl 1)**:538-539.
- Zhang, J., G. Randall, A. Higginbottom, P. Monk, C.M. Rice, and J.A. McKeating. 2004.** CD81 is required for hepatitis C virus glycoprotein-mediated viral infection. *Journal of Virology*. **78**:1448-1455.

- Zhang, P., C.G. Wu, K. Mihalik, M.L. Virata-Theimer, M.Y.W. Yu, H.J. Alter, and S.M. Feinstone. 2007.** Hepatitis C virus epitope-specific neutralizing antibodies in Igs prepared from human plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **104**:8449-8454.
- Zhang, P., L. Zhong, E.B. Struble, H. Watanabe, A. Kachko, K. Mihalik, M.L. Virata-Theimer, H.J. Alter, S. Feinstone, and M. Major. 2009.** Depletion of interfering antibodies in chronic hepatitis C patients and vaccinated chimpanzees reveals broad cross-genotype neutralizing activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **106**:7537-7541.
- Zhong, J., P. Gastaminza, G. Cheng, S. Kapadia, T. Kato, D.R. Burton, S.F. Wieland, S.L. Uprichard, T. Wakita, and F.V. Chisari. 2005.** Robust hepatitis C virus infection *in vitro*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **102**:9294-9299.
- Zhong, J., P. Gastaminza, J. Chung, Z. Stamataki, M. Isogawa, G. Cheng, J.A. McKeating, and F.V. Chisari. 2006.** Persistent hepatitis C virus infection *in vitro*: coevolution of virus and host. *Journal of Virology*. **80**:11082-11093.
- Zhong, W., A.S. Uss, E. Ferrari, J.Y. Lau, and Z. Hong. 2000.** De novo initiation of RNA synthesis by hepatitis C virus nonstructural protein 5B polymerase. *Journal of Virology*. **74**:2017-2022.
- Zibert, A., H. Meisel, W. Kraas, A. Schulz, G. Jung, and M. Roggendorf. 1997.** Early antibody response against hypervariable region 1 is associated with acute self-limiting infections of hepatitis C virus. *Hepatology*. **25**:1245-1249.
- Zubkova, I., Y.H. Choi, E. Chang, K. Pirollo, T. Uren, H. Watanabe, F. Wells, A. Kachko, K. Krawczynski, and M.E. Major. 2009.** T-cell vaccines that elicit effective immune responses against HCV in chimpanzees may create greater immune pressure for viral mutation. *Vaccine*. **27**:2594-2602.
- Zuo, G., Z. Li, L. Chen, and X. Xu. 2007.** Activity of compounds from Chinese herbal medicine *Rhodiola kirilowii* (Regel) Maxim against HCV NS3 serine protease. *Antiviral Research*. **76**:86-92.

