

# THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ LILLE II

École Doctorale Biologie - Santé de Lille

Pour l'obtention du grade de :

**Docteur de l'Université Lille II**

## Caractérisation d'inhibiteurs de l'entrée du Virus de l'Hépatite C

Présentée et soutenue publiquement par :

**Julie POTEL**

Le 21 décembre 2012

Devant le Jury composé de :

Pr. Didier HOBBER

Dr. Olivier SILVIE

Dr. François PENIN

Dr. Pierre-Emmanuel MILHIET

Dr. Eric RUBINSTEIN

Dr. Laurence COCQUEREL-DEPROY

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directrice de Thèse

***À mes parents,  
À Pierre, Louise et Gabin,***

*« Lorsque tu ne sais pas où tu  
vas, regarde d'où tu viens »*

Proverbe Africain

*« Il faut toujours viser la Lune,  
ainsi même en cas d'échec, on  
atterrit dans les étoiles »*

Oscar Wilde

# Remerciements

Cette thèse a été une aventure humaine d'une grande richesse, c'est pourquoi je tiens à remercier toutes les personnes avec qui je l'ai partagée.

Tout d'abord, je remercie les membres de mon jury, Didier Hober, Olivier Silvie, François Penin, Pierre-Emmanuel Milhiet et Eric Rubinstein, pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail.

Je remercie Jean de m'avoir accueillie dans son laboratoire. Tu diriges un laboratoire où il fait bon travailler, à la fois pour l'ambiance qui y règne mais aussi pour sa richesse nutritionnelle ! Et, grâce à tes conseils, je pars avec une conscience écologique plus aiguisée...

Un immense merci à Laurence, ma directrice de thèse. Pendant quatre années tu m'as formée, conseillée, épaulée et grâce à toi j'ai pu évoluer dans un contexte propice à mon épanouissement scientifique mais également personnel. J'espère avoir été à la hauteur de la formation que tu m'as donnée et je n'oublierai pas ce que tu as fait pour moi quand j'en ai eu besoin, ni nos nombreuses discussions. Merci d'avoir été si accessible et si disponible. Les qualités scientifiques et humaines dont tu as fait preuve au cours de mon encadrement m'ont fait mûrir tant sur le plan professionnel que personnel. Merci encore ...

Un merci particulier à Claire. Ma Clairette... J'ai découvert en toi une personne formidable. Au delà de tout ce que tu m'as transmis au labo, tu es une véritable amie. Merci pour les moments spéciaux (concerts, nuits à l'hôtel, crêpes...) mais aussi pour le quotidien au labo que tu as souvent rendu génial. Merci de toujours avoir été là, de m'avoir tant chouchoutée et tellement amusée ! Rendez-vous où tu sais !

Merci aux anciens membres de l'équipe Wint : Vera, Valentina, Julien... et particulièrement Birke. Tu as toujours répondu à mes (nombreuses) questions et tu as activement participé à l'accueil chaleureux que j'ai reçu dès mon arrivée au labo. Je garde un très bon souvenir des moments partagés ensemble, et notamment de ma première intervention orale en congrès et de mon premier séjour aux Etats-Unis.

Merci aux « mange-tard » : à Czes pour nos discussions animées, ses blagues et pour m'avoir appris le concept de « minutes polonaises » ; à André pour sa connaissance pointue de la météo et des destinations de vacances, mais aussi pour avoir toujours des cellules « au cas où ! » ; et à Soph pour son assistance technique qui m'a sauvée plus d'une fois de la menace informatique, pour son humour, sa disponibilité, les cours de danse et les nombreuses discussions... Je n'oublie pas Pierre-Yves et Khaled, le grand pigeon et le petit lapin, qui m'ont entourée pendant une grande partie de mon séjour au labo.

Merci aux « mange-tôt » : à Sandrine pour son aide et ses conseils scientifiques, ses talents culinaires et sa bienveillance ; à Nath, une vraie fille avec qui j'adore discuter mode et shopping, merci aussi pour la rigueur avec laquelle tu gères le calendrier des anniversaires et le départ à la cantine ; à Yves (et ses légendaires Stan Smith) pour être toujours accessible et plein de légèreté ; à Lucie, ma colocataire tête en l'air de Nijmegen, pour ses bêtises, ses étrangetés et sa bonne humeur ; à Thibaut pour avoir toujours quelque chose à raconter et souvent à manger ; à Noémie pour les moments privilégiés et amusants que nous avons passés ensemble.

Merci aussi à Karin, Muriel, Ahmed, Yan et à ceux qui sont partis, Xavier, Sohail ... Plus spécialement je remercie Lucie et Anna, les body-combattantes, ainsi que Gaby, pour leur gentillesse et les moments passés au labo ou en dehors.

Merci aux « encore plus anciens ! » : à David et ses passages au labo qui valaient bien un petit café à chaque fois ; à François pour son aide et la quantité de blagues qu'il a en stock ; et surtout à Ioan, avec qui j'ai passé des moments mémorables, merci pour les mojitos, les rires et les encouragements. En français, anglais, roumain ou langage des signes, ça n'était pas gagné d'avance mais on a fini par savoir se comprendre !

Merci aux « mange au RU » : à Jérémy pour sa simplicité, sa décontraction et sa gentillesse ; et particulièrement à Rayan. Mon copain Rians, j'ai trouvé en toi plus qu'un collègue. Tu as un caractère bien trempé et le cœur sur la main, une association détonante ! Tu as été là pour discuter de tout ou rien, pour me motiver ou me rassurer et on a passé de bons moments de détente bien mérités ! Merci pour tout ça...

Je tiens aussi à remercier Marie-Christine qui fait un travail impressionnant pour le labo et que j'ai particulièrement sollicitée pour mes voyages à Montpellier.

Merci également à Marie-Claire Peers qui m'a intégrée à son équipe d'enseignement ainsi qu'aux moniteurs et assistants avec qui j'ai partagé cette expérience. Un merci spécial à Johann qui m'a soutenue depuis le début de mes études lilloises.

Merci à mes deux copains du 3<sup>ème</sup>... Désolée de partir la première mais c'est promis, je ne vous laisserai pas tomber, en espérant vous donner au moins autant que ce que vous m'avez apporté.

Je remercie tout d'abord Loïc, mon acolyte depuis mon arrivée à Lille. Merci d'être si cool, de pouvoir aussi bien parler de science que d'autre chose, et surtout d'autre chose !

Je remercie également Tian. Mon ami... Je voudrais te remercier pour tellement de choses : nos rires, ton soutien, ton écoute, ta gentillesse, pour ce que tu m'apprends, pour tes conseils avisés sur la vie et tes dictons chinois, pour la confiance que nous avons l'un en l'autre et les moments précieux que nous partageons... Alors merci pour tout...

Je tiens à remercier le laboratoire de Montpellier qui m'a plusieurs fois accueillie. Tout d'abord, merci à Pierre-Emmanuel Milhiet d'avoir collaboré avec nous sur le projet EWI-2wint et d'avoir accepté de me recevoir. Au delà de l'aspect professionnel, merci pour ta gentillesse et les conseils que tu m'as donnés. Bien sûr, je remercie Patrice Rassam, mon doctorant (maintenant docteur !) Montpelliérain préféré. Quel plaisir de t'avoir rencontré. Ta personnalité hors du commun et les nombreuses heures passées au TIRF en ta compagnie me laissent des souvenirs incroyables. Merci également aux autres membres du CBS de Montpellier et particulièrement à Julien.

Je remercie aussi Cyril Couturier, Didier Hober, Famara Sané et Catherine François pour leur implication dans mes projets.

Je remercie tout particulièrement les membres de ma famille.

Tout d'abord, merci à ma Mamie que j'adore et qui a un don incroyable pour me faire pleurer de rire régulièrement.

Merci à Pepmem, qui ont participé à me donner goût aux études et plus encore à la gastronomie !

Merci à mes tantes et oncles, plus particulièrement à Fabienne qui n'est jamais loin et me gâte, mais aussi à Patrice, Mathilde (ma tante Fahrenheit !), Narcisse (mon oncle saucisse.. !), Béa, Martine et Pascal.

Je tiens à remercier particulièrement Jean-Marc qui, plus qu'un oncle, occupe une place particulière dans ma vie et à tant fait pour moi.

Merci à mes cousins. Plus spécialement, merci à Simon qui s'est souvent révélé être un ami et dont les jeux puérils m'amuse encore... ! Et merci à Camille, ma cousine, parce qu'on partage à la fois les choses sérieuses et moins sérieuses de la vie et parce que tout ça serait bien moins chouette sans toi.

Merci à celui qui, ami au départ, est devenu un membre à part entière de notre famille : Martin. Depuis 15 ans tu es dans les parages et on grandit côte à côte. On en a partagées des choses et je n'imagine pas tout ça sans toi. Merci d'être toujours là... Tu vois ça y est, les éprouvettes ont enfin changé de couleur ...!

Merci à Christine, Clem, Richard, Laura et Lucas de toujours me recevoir avec le sourire et de me faire une place dans leur famille.

Un énorme merci à Flo. Depuis notre rencontre il y a un peu plus de 10 ans, on en a fait du chemin... Aujourd'hui tu es là, fort quand je faiblis, simple quand je suis compliquée, motivé quand je doute... Cette dernière année a été bien remplie, merci de l'avoir partagée avec moi. Aussi, bravo pour tes progrès culinaires et merci de m'avoir si bien nourrie pendant l'écriture de ma thèse !

Un grand merci à mes frères et sœur, mes repères, dont je suis très fière.

Merci à Pierre, mon grand frère, dont le métier est à l'image du personnage : complexe, fou et passionnant. Grandir avec toi a été une aventure mêlant soutien, bêtises, rires et chamailleries... A croire qu'on n'a pas vraiment mûri !

Merci à Louise, ma petite sœur, et à Gabin, mon petit frère. Etre votre grande sœur est le plus beau rôle que j'ai à jouer.

Enfin, je dédie mes remerciements les plus spéciaux à mes parents. Merci Maman d'avoir fait au mieux, d'avoir été là à chaque instant et de continuer à tout faire pour me rendre heureuse. Merci Papa d'être présent, de comprendre et de m'aider à trouver les réponses aux questions que je me pose encore. Ce proverbe me semble plus approprié que tous les longs discours pour résumer ce que je vous dois :

*« Les parents font deux choses pour leurs enfants : ils leur donnent des racines et ils leur ouvrent les ailes »*

# Sommaire

Résumé .....	10
Abstract .....	11
Liste des abréviations .....	12
Liste des figures et tableaux .....	16
<b>1) INTRODUCTION .....</b>	<b>18</b>
<b>A. L'hépatite C .....</b>	<b>19</b>
<b>1. Les hépatites virales .....</b>	<b>19</b>
<b>2. Découverte du virus de l'hépatite « non A - non B ».....</b>	<b>19</b>
<b>3. Epidémiologie .....</b>	<b>20</b>
a) Prévalence.....	20
b) Modes de contamination.....	22
<b>4. Pathogenèse et évolution de la maladie .....</b>	<b>23</b>
a) L'hépatite C aiguë.....	24
b) L'hépatite C chronique.....	25
c) Les manifestations extra-hépatiques .....	28
<b>5. Les méthodes de diagnostic .....</b>	<b>28</b>
a) Outils de diagnostic indirects .....	29
b) Outils de diagnostic directs .....	30
<b>6. La réponse immunitaire anti-VHC .....</b>	<b>31</b>
a) L'immunité innée .....	31
b) L'immunité adaptative.....	33
❖ La réponse cellulaire .....	33
❖ La réponse humorale .....	35
❖ L'existence d'une mémoire immunologique .....	37
<b>7. Les thérapies .....</b>	<b>37</b>
a) La bithérapie .....	38
b) Les nouvelles molécules.....	39
❖ Télaprévir et bocéprévir : la première trithérapie .....	39
❖ Molécules en cours d'essai clinique .....	40
c) Les perspectives de vaccination .....	43
<b>B. Le virus de l'hépatite C.....</b>	<b>45</b>
<b>1. Classification et variabilité génomique.....</b>	<b>45</b>
<b>2. La particule virale .....</b>	<b>47</b>
<b>3. L'organisation génomique .....</b>	<b>48</b>
a) Les extrémités non-codantes.....	49
b) Les protéines virales.....	50
❖ La protéine de capsid .....	51
❖ La protéine F .....	52
❖ Les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 .....	52
❖ p7.....	52
❖ NS2.....	53
❖ NS3/4A .....	54

❖ NS4B.....	55
❖ NS5A.....	57
❖ NS5B.....	58
<b>4. Les modèles d'étude .....</b>	<b>59</b>
a) Les modèles cellulaires.....	60
❖ Infection par le VHC isolé chez des patients.....	60
❖ Systèmes d'expression hétérologue des glycoprotéines d'enveloppe .....	60
❖ Réplicons génomiques et sous-génomiques.....	61
❖ Pseudovirions et virosomes .....	62
❖ Particules rétrovirales pseudotypées VHC .....	63
❖ Production du VHC en culture cellulaire.....	66
b) Les modèles animaux.....	68
❖ Le chimpanzé .....	68
❖ Les souris humanisées .....	69
<b>5. Le cycle viral.....</b>	<b>71</b>
a) Attachement, internalisation et fusion .....	72
b) Synthèse des protéines virales.....	73
c) Réplication du génome viral .....	73
d) Assemblage et sécrétion .....	74
<b>C. L'entrée du VHC.....</b>	<b>78</b>
<b>1. Les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2.....</b>	<b>79</b>
<b>2. Les acteurs cellulaires.....</b>	<b>85</b>
a) Les molécules d'attachement.....	85
❖ Les lectines.....	85
❖ Les GAGs.....	86
❖ Le LDL-R.....	87
b) Les récepteurs d'entrée du VHC .....	88
❖ La tétraspanine CD81 .....	88
❖ Le récepteur SRB1 .....	95
❖ Les claudines .....	98
❖ OCLN, une autre protéine des TJ .....	103
❖ Les molécules récemment impliquées dans l'entrée du VHC .....	105
<b>3. L'endocytose et la fusion.....</b>	<b>107</b>
<b>D. Les tétraspanines, leurs partenaires et les TEM .....</b>	<b>109</b>
<b>1. La structure des tétraspanines .....</b>	<b>110</b>
a) Les boucles extracellulaires .....	111
b) Les segments transmembranaires .....	112
c) Les régions intracellulaires .....	113
<b>2. L'expression tissulaire et la localisation subcellulaire des tétraspanines .....</b>	<b>114</b>
<b>3. Les microdomaines enrichis en tétraspanines (TEM) .....</b>	<b>116</b>
a) Caractérisation des TEM.....	116
b) Les partenaires des tétraspanines.....	120
c) La dynamique des tétraspanines .....	121
<b>4. Les fonctions des tétraspanines .....</b>	<b>126</b>
a) Une famille multifonctionnelle.....	126
b) Les tétraspanines et l'infection .....	127
❖ Les tétraspanines et le VIH.....	128
❖ Les tétraspanines et Plasmodium .....	130

<b>E. Influence des TEM et des protéines EW1 sur l'entrée du VHC ...</b>	<b>135</b>
<b>1. Le rôle des TEM dans l'entrée.....</b>	<b>135</b>
a) Les lipides et l'entrée du VHC.....	135
b) Les TEM et l'entrée du VHC .....	135
<b>2. Les protéines EW1.....</b>	<b>136</b>
a) Les protéines EW1 et les tétraspanines .....	136
b) Expression tissulaire et localisation subcellulaire des protéines EW1-2 et EW1-F.....	138
c) Les fonctions de EW1-2 et EW1-F.....	140
d) EW1-2wint.....	143
<b>2) CONTEXTE ET OBJECTIFS DES TRAVAUX .....</b>	<b>148</b>
<b>Article 1 : Etude du mécanisme par lequel EW1-2wint bloque l'entrée du VHC ..</b>	<b>149</b>
<b>Article 2 : Effet de la Monensine sur l'infection par le VHC .....</b>	<b>151</b>
<b>3) RESULTATS .....</b>	<b>155</b>
<b>Article 1 : EW1-2wint promotes CD81 clustering that abrogates HCV entry .....</b>	<b>156</b>
<b>Article 2 : Monensin inhibits a late step of HCV entry.....</b>	<b>158</b>
<b>4) DISCUSSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>190</b>
<b>Article 1 : EW1-2wint bloque l'entrée du VHC en modulant la compartimentation de CD81 à la membrane .....</b>	<b>191</b>
a) EW1-2wint influence la dynamique de CD81 et l'entrée du VHC .....	191
b) EW1-2wint favorise la reconnaissance par l'anticorps MT81w.....	194
c) L'anticorps MT81w est un anticorps de faible affinité dirigé contre le mCD81 .....	195
d) Le VHC n'utilise pas les clusters de CD81 pour entrer dans les cellules.....	196
e) Effet d'EW1-2wint sur les complexes CD81-CLDN-1 .....	199
f) EW1-2wint n'inhibe pas la transmission de cellule à cellule du VHC .....	201
g) La poursuite de la caractérisation de EW1-2wint .....	202
<b>Article 2 : La Monensine inhibe une étape tardive de l'entrée du VHC.....</b>	<b>204</b>
a) La Monensine inhibe l'entrée du VHC.....	204
b) La Monensine n'agit pas sur les particules virales .....	205
c) La Monensine interfère avec une étape tardive de l'entrée virale .....	206
d) La Monensine agit sur le pH intracellulaire et bloque probablement l'étape de fusion ....	207
e) La Monensine inhibe la transmission du virus de cellule à cellule.....	209
f) L'effet additif de la Monensine et l'IFN.....	209
g) Conclusion de cette étude.....	210
<b>5) BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>212</b>
<b>6) ANNEXES .....</b>	<b>261</b>

# Résumé

L'entrée du virus de l'hépatite C (VHC) dans les hépatocytes, est un processus complexe et séquentiel mettant en jeu des facteurs d'attachement et d'entrée. Parmi les facteurs d'entrée du VHC, la protéine CD81 joue un rôle majeur et s'associe à Claudine-1 (CLDN-1), une protéine des jonctions serrées. La formation des complexes CD81-CLDN-1 est essentielle à l'entrée du VHC. Après l'interaction avec les récepteurs membranaires, le VHC est internalisé par une voie dépendante de la clathrine. Puis, la fusion des membranes cellulaire et virale dans les endosomes précoces, suivie de la décapsidation, libère le génome dans le cytoplasme. Durant ma thèse, j'ai étudié l'étape d'entrée du VHC dans ses cellules cibles et, plus précisément, j'ai caractérisé deux inhibiteurs : **EWI-2wint**, un inhibiteur naturel de l'entrée du VHC, et la **Monensine**, une drogue qui favorise l'alcalinisation des compartiments intracellulaires.

CD81 appartient à la famille des tétraspanines, dont les membres ont la caractéristique d'interagir entre eux ainsi qu'avec des molécules partenaires. Ces interactions participent à la formation de zones enrichies en tétraspanines (TEAs), parfois appelées microdomaines enrichis en tétraspanines (TEM), à la membrane plasmique. Les mécanismes précis d'interaction au sein et en dehors de ces zones membranaires particulières ne sont pas connus. En 2008, le laboratoire a identifié EWI-2wint, une forme tronquée de la protéine EWI-2, qui interagit avec CD81 et CD9, une autre tétraspanine. De manière intéressante, EWI-2wint est exprimée dans de nombreuses lignées cellulaires mais est absente dans les lignées hépatocytaires. Contrairement à la surexpression de la protéine parentale EWI-2, son expression ectopique dans les hépatocytes bloque l'entrée du VHC par un mécanisme encore non identifié. En 2009, nous avons montré que le VHC n'utilise pas les molécules de CD81 associées aux TEM pour entrer dans les cellules, c'est pourquoi une partie de ma thèse a été consacrée à l'étude de l'effet de EWI-2wint sur la répartition de CD81 à la membrane. Pour cela, nous avons généré des clones cellulaires permissifs au VHC exprimant CD81 d'origine murine en combinaison avec EWI-2wint ou des protéines contrôles. Ainsi, grâce à l'utilisation d'un anticorps reconnaissant préférentiellement les molécules de CD81 associées à d'autres tétraspanines, nous avons montré que l'inhibition de l'infection induite par EWI-2wint est corrélée à une plus forte association de CD81 avec les TEAs, suggérant que EWI-2wint pourrait bloquer l'entrée du VHC en favorisant l'association de CD81 avec les TEAs. Afin d'affiner ces résultats, nous avons analysé l'effet de EWI-2wint sur la dynamique membranaire de CD81 dans des expériences de suivi de particules uniques en microscopie TIRF. De cette manière, nous avons défini les coefficients de diffusion ainsi que les types de trajectoires de nombreuses molécules de CD81, en absence et en présence de EWI-2wint. De manière intéressante, nous avons montré que EWI-2wint induit un ralentissement de la dynamique de CD81 et favorise son confinement, ce qui confirme une modification de la distribution membranaire de CD81 en présence de EWI-2wint. Egalement, nos résultats indiquent que EWI-2wint favorise l'association de CD81 avec des zones enrichies en CD81 ainsi que sa colocalisation avec CLDN-1. Ce travail améliore la compréhension du mécanisme par lequel EWI-2wint inhibe l'entrée du VHC et met également en lumière l'importance de la dynamique membranaire au cours de ce processus.

Un deuxième axe de recherche de ma thèse a été consacré à l'étude de l'effet de la Monensine sur l'infection par le VHC. La Monensine est un ionophore qui module l'infection par différents pathogènes, dont *Plasmodium* et de nombreux virus. Nos expériences ont montré que la Monensine inhibe une étape tardive de l'entrée du VHC, correspondant probablement à la fusion dans les endosomes précoces. Nous avons confirmé son effet sur le pH et avons rapporté son effet inhibiteur sur l'infection par plusieurs virus enveloppés. Egalement, nos expériences ont indiqué un effet additif de la Monensine et de l'interféron, ainsi qu'un blocage des deux voies de transmission du VHC : l'entrée médiée par des particules virales libres et le passage du virus directement de cellule à cellule. L'ensemble de ces résultats confirme l'importance du pH acide des endosomes dans les deux voies d'entrée du VHC et décrit un nouvel inhibiteur de l'entrée du VHC qui pourra, à l'avenir, être utile à l'étude de l'étape de fusion.

# Abstract

Hepatitis C Virus (HCV) entry in its target cells, the hepatocytes, is a complex and sequential mechanism. Indeed, HCV uses several attachment and entry factors to enter in the hepatocytes. Among these entry factors, CD81 plays a major role and it associates with the tight junction protein Claudin-1 (CLDN-1) to form coreceptor complexes that are critical for HCV entry. After binding to the cell surface, HCV particles are internalized by clathrin-mediated endocytosis, then a fusion step between viral and cellular membranes occurs in the early endosomes. During my thesis, I have mainly focused on HCV entry and more precisely on two inhibitors of this step: **EWI-2wint**, a natural inhibitor of HCV entry, and **Monensin**, a drug that raises the intracellular pH.

CD81 belongs to the tetraspanin family whose members have a strong propensity to multimerize and interact with numerous partner proteins forming scaffolds in membranes, recruiting or excluding specific proteins involved in particular cellular processes. The most obvious evidence of interaction of tetraspanins and their partners is coming from the presence at the plasma membrane of tetraspanin-enriched areas (TEAs) often identified to tetraspanin-enriched microdomains (TEM). However, the precise mechanisms of interaction within and outside these clusters are still poorly understood. Few years ago, the laboratory has identified EWI-2wint, a cleavage product of EWI-2 that still interacts with CD81 and CD9 and can be found in most cell lines expressing EWI-2 but not in hepatocytes. Importantly, in contrast to full-length EWI-2, EWI-2wint inhibits HCV entry by a mechanism that remained to be elucidated. Because we have shown that HCV does not use TEM-associated CD81 to enter the cells, the first aim of my study was to analyse the effect of EWI-2wint on CD81 partitioning at the plasma membrane. To do so, we generated HCV permissive cell lines expressing murine CD81 (mCD81) in combination with EWI-2wint or control proteins. Thanks to antibodies that recognize TEA-associated mCD81, we found that inhibition of HCV infection induced by EWI-2wint correlates with an increased association of CD81 with TEA, indicating that EWI-2wint might inhibit HCV entry by promoting CD81 association with TEA. To strengthen this observation, we analyzed the membrane dynamics and partitioning of human CD81 molecules in Huh-7 cells by single-molecule fluorescence microscopy. We defined the diffusion rate and the type of motion of single CD81 molecules in presence or in absence of EWI-2wint. Interestingly, we found that EWI-2wint induces a decrease in the global diffusion of CD81 molecules and an increase in the proportion of confined trajectories confirming that a change in CD81 membrane partitioning occurs in presence of EWI-2wint. Indeed, further studies showed that EWI-2wint promotes confinement of CD81 in CD81-enriched areas. In addition, we showed that EWI-2wint influences the colocalization of CD81 with Claudin-1. This study gives new insights on the mechanism by which EWI-2wint inhibits HCV entry and about the dynamics involved in this step.

In the second part of my work, I have analysed the effect of Monensin on HCV infection. Monensin is an ionophore, which has been shown to modulate infection of numerous pathogens, including *Plasmodium* and several viruses. We found that Monensin inhibits HCV infection by impairing a late step of the entry process, most likely by inhibiting the fusion step in endosomes. Indeed, we confirmed that this drug increases the intracellular pH in our experimental conditions. In addition, Monensin inhibited infection by several other enveloped viruses. We also demonstrated an additive effect of Monensin when combined with interferon. Finally, we observed an inhibition of both cell-free and cell-to-cell transmission of HCV by Monensin. Together, our data highlights the importance of the acidic pH in early endosomes in the two entry routes used by HCV and describes a new entry inhibitor which could be use in the future to study the fusion step of the HCV life cycle.

# Liste des abréviations

3' / 5' NC : extrémité 5' / 3' non codante

## A

**ADN** : Acide Desoxyribonucléique  
**ADNc** : ADN complémentaire  
**ApoB / E** : Apolipoprotéine B / E  
**ARFP** : Alternative Ribosomal Frameshift Protein  
**ARN** : Acide Ribonucléique  
**ARNm** : ARN messenger  
**ATP** : Adenosine-5'-Triphosphate

## B

**bdNA** : branched- Deoxyribonucleic Acid

## C

**C9BB** : Anticorps anti-CD9 reconnaissant préférentiellement les oligomères de CD9  
**CAR** : Coxsackie virus and Adenovirus Receptor  
**CB** : Canalicule Biliaire  
**CD9P-1** : CD9 Partner-1  
**CHO** : Chinese Hamster Ovary  
**CLDN-1 / 6 / 9** : Claudine 1 / 6 / 9  
**CMV** : Cytomégalovirus  
**CVB** : Virus Coxsackie B

## D

**DC-SIGN** : Dendritic-Cell-Specific ICAM-3 Grabbing Non-integrin  
**DGAT1** : Diacylglycerol Acyltransferase-1  
**DGV** : Dépistage Génomique viral

## E

**EGFR** : Epidermal Growth Factor Receptor  
**EIAs** : Enzyme Immunoassays  
**eIF2 / 3** : eukaryotic Initiation Factor 2 / 3  
**EL1 / 2** : Extracellular Loop 1 / 2  
**EMA** : European Medicines Agency  
**EMCV** : Virus de l'Encéphalomyocardite  
**EphA2** : Ephrin Receptor A2  
**EWI-2wint** : EWI-2 without its N-terminus

## **F**

**Fah** : Fumaryl acetoacetate hydrolase  
**FDA** : Food and Drug Administration  
**FRAP** : Fluorescence Recovery After Photobleaching  
**FRET** : Fluorescence Resonance Energy Transfer

## **G**

**GAGs** : Glycosaminoglycanes  
**GBF1** : Golgi-associated Brefeldin A-resistant Factor 1  
**GFP** : Green Fluorescent Protein  
**GLs** : Gouttelettes Lipidiques  
**GTP** : Guanosine Triphosphate

## **H**

**HB-EGF** : Heparin Binding EGF-like Growth Factor  
**hCD81** : CD81 humaine  
**HDL** : High Density Lipoprotein  
**Hsp** : Heat Shock Protein  
**HSV** : Herpes Simplex Virus  
**HTLV-1** : Human T-lymphotropic virus type 1  
**hVAP-A** : human Vesicle-Associated membrane Protein-associated protein A  
**HVR1 / 2** : Intergenotypic Variable Region 1 / 2

## **I**

**IFN** : Interféron  
**Ig** : Immunoglobuline  
**IgVR** : Intergenotypic Variable Region  
**IL** : Interleukine  
**IL-2 $\gamma$**  :  $\gamma$ -chain of the receptor for IL-2  
**IRES** : Site Interne d'Entrée des Ribosomes

## **J**

**JAK** : Janus Kinase  
**JFH-1** : Japanese Fulminant Hepatitis- isolate 1

## **L**

**L-SIGN** : Liver/lymph node-Specific ICAM-3 Grabbing Non-integrin  
**LB** : Lymphocyte B  
**LDL** : Low Density Lipoprotein  
**LDLox** : LDL oxydées  
**LDLR** : Pécepteur aux LDL  
**LEL** : Large extracellular Loop  
**LT** : Lymphocyte T

**LVP** : Lipoviroparticules

## **M**

**MAPK** : Mitogen-Activated Protein Kinase

**MAVS** : Mitochondrial Antiviral Signaling

**M $\beta$ CD** : Méthyl- $\beta$ -cyclodextrine

**mCD81** : CD81 murin

**MHC** : Major Histocompatibility Complex

**MLV** : Murine Leukemia Virus

**MT81** : anticorps anti-mCD81

**MT81 $w$**  : anticorps anti-mCD81 reconnaissant mCD81 associée à d'autres tétraspanines

**MTP** : Microsomal Triacylglycerol transfer Protein

## **N**

**NPC1L1** : Niemann-Pick C1-like 1

**NK** : Natural Killer

**NTPase** : Nucleotide Triphosphatase

## **O**

**OCN** : Occludine

**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé

**ORF** : Open Reading Frame

## **P**

**PAMPs** : Pathogen-Associated Molecular Patterns

**PCR** : Polymerase Chain Reaction

**PEG** : polyéthylène-glycol

**PKI** : Inhibiteurs de Protéines Kinases

**PKR** : Protein Kinase R

**PRK2** : Protein kinase C-Related Kinase 2

## **R**

**RAG2** : Recombination activating gene 2

**RBV** : Ribavirine

**RE** : Réticulum Endoplasmique

**RIG-I** : Retinoic acid-Inducible Gene-1

**RMN** : *Résonance Magnétique Nucléaire*

**RT-PCR** : Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction

**RTK** : Récepteurs Tyrosine Kinase

## **S**

**SAA** : Apolipoprotéine Sérum Amyloïde A

**Sc1** : Scramblase 1

**SCID** : Severe Combined Immuno Deficiency  
**sE2** : E2 soluble  
**SEL** : Small Extracellular Loop  
**SinV** : virus Sindbis  
**sLEL** : LEL soluble  
**Smase** : Sphingomyélinase  
**SMT** : Single-Molecule Tracking  
**SRB1 / 2** : Scavenger Receptor Class B Type 1 / 2  
**SREBPs** : Sterol Regulatory Element-Binding Proteins  
**ST** : Stem  
**STAT** : Signal Transducer and Activator of Transcription  
**STING** : Stimulator of Interferon Genes  
**SV40** : Simian Virus 40  
**SVF** : Virus de la Forêt de Semliki

## **T**

**TEAs** : Tetraspanin-Enriched Areas  
**TEM** : Tetraspanin-Enriched Microdomains  
**TIRF** : Total Internal Reflexion Fluorescence  
**TJ** : Tight Junctions  
**TLR** : Toll-Like Receptor  
**TMA** : Transcription-Mediated Amplification  
**TM** : Segment transmembranaire  
**TRIF** : TLR domain containing adaptor inducing IFN- $\beta$   
**Tspan-C8** : Tétraspansines possédant huit cystéines au niveau de la LEL

## **U**

**UP** : Uroplakines  
**uPA** : Urokinase-type Plasminogen Activator

## **V**

**VHA** : Virus de l'Hépatite A  
**VHB** : Virus de l'Hépatite B  
**VHC** : Virus de l'Hépatite C  
**VHCcc** : particules virales du VHC produites en culture cellulaire  
**VHCpp** : particules rétrovirales pseudotypées VHC  
**VHE** : Virus de l'Hépatite E  
**VIH** : Virus de l'Immunodéficience Humaine  
**VLDL** : Very Low Density Lipoprotein  
**VLP** : Virus Like Particles  
**VSV** : Virus de la Stomatite Vésiculaire

## **Y**

**YFV** : Yellow Fever Virus

# Liste des figures et tableaux

## Figures :

<b>Figure 1 :</b> Prévalence du VHC dans le monde .....	20
<b>Figure 2 :</b> Evolution d'une infection causée par le VHC.....	24
<b>Figure 3 :</b> Représentation schématique de la réponse immunitaire cellulaire au cours de l'infection par le VHC.....	35
<b>Figure 4 :</b> Répartition des génotypes du VHC dans le monde .....	46
<b>Figure 5 :</b> Représentation schématique de la lipovirionparticule du VHC .....	48
<b>Figure 6 :</b> Organisation génomique du VHC.....	48
<b>Figure 7 :</b> Les protéines du VHC et leur association avec la membrane du RE .....	50
<b>Figure 8 :</b> Représentation schématique de réplicons du VHC.....	62
<b>Figure 9 :</b> Représentation schématique de la production de VHCpp.....	64
<b>Figure 10 :</b> Représentation schématique du système de production des VHCcc .....	68
<b>Figure 11 :</b> Cycle viral putatif du VHC .....	72
<b>Figure 12 :</b> Modèle de l'assemblage des particules virales du VHC.....	76
<b>Figure 13 :</b> Modèle de l'entrée virale .....	78
<b>Figure 14 :</b> Représentation schématique des glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 du VHC .....	81
<b>Figure 15 :</b> Modèle de la structure de l'ectodomaine de E2.....	82
<b>Figure 16 :</b> La tétraspanine CD81.....	89
<b>Figure 17 :</b> Structure du récepteur SRB1.....	96
<b>Figure 18 :</b> Représentation schématique de la polarisation des hépatocytes .....	99
<b>Figure 19 :</b> Représentation schématique de la structure de CLDN-1 et OCLN .....	101
<b>Figure 20 :</b> Représentation schématique de la fusion de la glycoprotéine E des <i>Flavivirus</i> .....	108
<b>Figure 21 :</b> Arbre phylogénétique des tétraspanines humaines.....	109
<b>Figure 22 :</b> Effet de différentes conditions de détergent sur l'organisation du <i>tetraspanin web</i> .....	116
<b>Figure 23 :</b> Représentation schématique de la technique de FRET.....	122

<b>Figure 24:</b> Représentation schématique de la technique de FRAP.....	122
<b>Figure 25:</b> Représentation schématique de la microscopie TIRF .....	123
<b>Figure 26:</b> Représentation schématique d'une trajectoire Brownienne, une trajectoire confinée et une trajectoire mixte .....	124
<b>Figure 27:</b> Vue dynamique de l'organisation du <i>tetraspanin web</i> .....	125
<b>Figure 28:</b> Cycle de vie de <i>Plasmodium falciparum</i> .....	131
<b>Figure 29:</b> Les protéines de la famille EWI .....	137
<b>Figure 30:</b> Représentation schématique de EWI-2 et EWI-2wint.....	144
<b>Figure 31:</b> Les régions de CD81 et EWI-2/EWI-2wint impliquées dans leur interaction .....	146
<b>Figure 32:</b> La Monensine.....	151
<b>Figure 33:</b> Modèle de la dynamique de CD81 et CLDN-1 en absence et en présence de EWI-2wint.....	200

## Tableaux :

<b>Tableau 1:</b> Molécules antivirales en cours d'étude clinique de phases II et III .....	43
<b>Tableau 2:</b> Classification du VHC au sein de la famille des <i>Flaviviridae</i> .....	45
<b>Tableau 3:</b> Exemples de partenaires moléculaires connus de tétraspanines.....	120

# **1) INTRODUCTION**

## A. L'hépatite C

### 1. Les hépatites virales

Une hépatite virale est une inflammation du foie dont la cause est l'infection par un virus. Les Virus des Hépatites A à E font partie de ces agents dont l'infection entraîne une hépatite. Bien que très différents et classés dans des genres séparés, ces virus provoquent tous des hépatites dites « aiguës », mais certains (B, C et D) provoquent ensuite des hépatites dites « chroniques », qui se caractérisent par une virémie persistante à plus long terme. Cette chronicité peut évoluer en cirrhose puis en hépatocarcinome et à terme, nécessiter une transplantation hépatique.

### 2. Découverte du virus de l'hépatite « non A - non B »

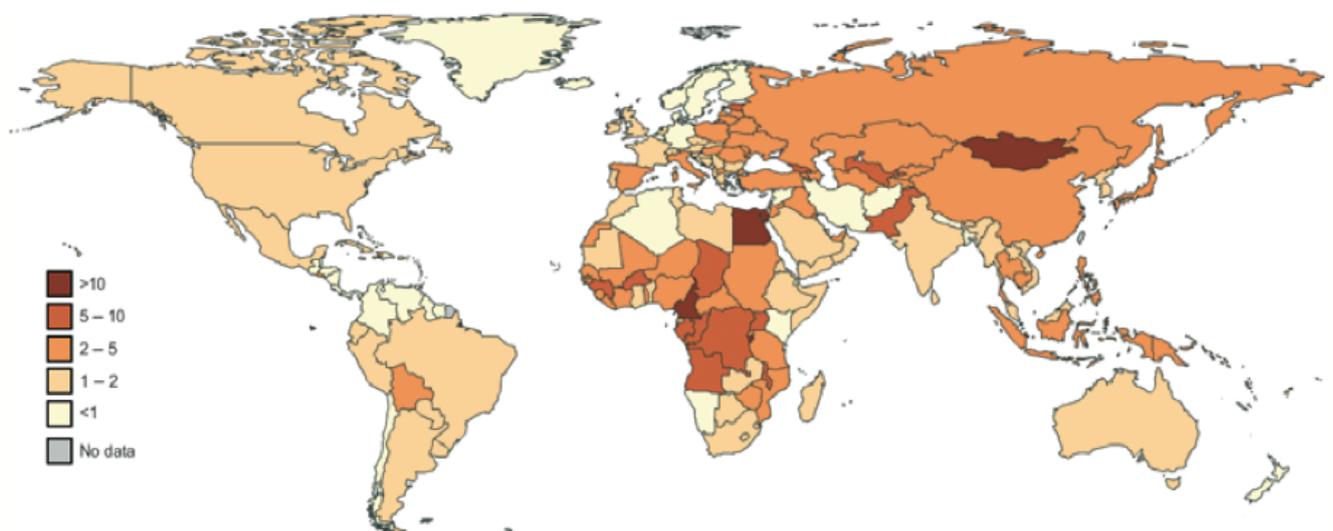
Dans les années 1970, les principaux agents infectieux responsables d'hépatites ont été identifiés et appelés Virus de l'Hépatite A (VHA) et Virus de l'Hépatite B (VHB). À partir de là, des outils de prévention et de diagnostic ont été mis en place. Malgré cela, de nouveaux cas d'hépatites virales (notamment post-transfusionnelles) étaient encore rapportés, avec des diagnostics incriminant des virus différents du VHA et du VHB. La maladie causée par ces agents non encore identifiés fut donc appelée : « Hépatite Non A - Non B » (Feinstone *et al.*, 1975; Prince *et al.*, 1974). Deux voies de transmission ont été décrites pour ces hépatites Non A - Non B : la voie entérale (ou oro-fécale) et la voie parentérale (via le sang et ses dérivés). C'est vers la fin des années 80 que les agents responsables de ces hépatites Non A- Non B ont été identifiés : le Virus de l'Hépatite E (VHE), responsable de la majorité des hépatites Non A - Non B à transmission entérale, et le Virus de l'Hépatite C (VHC), causant la majorité des hépatites Non A - Non B à transmission parentérale (Choo *et al.*, 1989). Le VHC est un virus enveloppé, à ARN simple brin de polarité positive et d'un diamètre d'environ 60nm. Il a été classé dans la famille des *Flaviviridae* qui compte quatre genres : les *Flavivirus*, les *Pestivirus*, les *Hépacivirus* et les *Pégivirus*. Avec la découverte du VHC par l'équipe de Michael Houghton, c'est la première fois qu'un génome viral est cloné avant que l'agent infectieux n'ait pu être isolé. En effet, l'identification du génome de ce virus a été permise par des

techniques de biologie moléculaire utilisées pour cloner une souche virale isolée à partir d'un chimpanzé infecté.

L'impossibilité de propager le virus en culture cellulaire jusqu'en 2005 et l'absence de modèles animaux facilement utilisables ont longtemps freiné l'étude du VHC. L'hépatite C est une maladie largement distribuée à travers le monde et qui évolue très souvent vers la chronicité, ce qui en fait un problème majeur de santé publique. À ce jour, aucun vaccin n'est disponible pour lutter contre cette maladie et les traitements présentent une efficacité encore limitée.

### 3. Epidémiologie

#### a) Prévalence



**Figure 1** : Prévalence du VHC dans le monde (d'après Lavanchy *et al.*, 2011)

L'Hépatite C sévit dans le monde entier : dans les pays industrialisés et les pays en développement. Il est difficile d'évaluer précisément la prévalence de cette maladie au niveau mondial, national et local. En effet, la majorité des hépatites aiguës sont asymptomatiques et de nombreuses personnes ne savent pas qu'elles sont porteuses du

virus. Un deuxième exemple de biais relatif à ces études de prévalence provient des échantillons de personnes étudiées. Souvent, les études sont conduites au sein de groupes précis, plus ou moins à risque (patients hémodialysés, donneurs de sang, co-infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) ...) et qui ne sont pas nécessairement représentatifs de la population mondiale. Malgré tout, il est reconnu que la prévalence de cette maladie varie d'une région à une autre du globe et d'un pays à un autre (Lavanchy, 2009). Les données actuelles estiment le nombre de personnes infectées à 130-170 millions, ce qui représente 2 à 3% de la population mondiale. La distribution géographique n'est pas homogène (**Figure 1**), avec des pays à prévalence basse, notamment en Europe Occidentale ou en Amérique du Nord où elle est inférieure à 2,5%, et des pays à prévalence bien plus élevée notamment en Europe de l'est (1 à 5%), en Afrique et en Asie (1 à 15%) (Lavanchy, 2011). Le pays présentant la prévalence la plus forte est l'Égypte. Historiquement, cela s'explique notamment par une campagne nationale de traitement contre la schistosomiase à partir des années 1920 et jusque dans les années 1980. Durant cette période, le traitement délivré via des injections intraveineuses a conduit à une explosion de la transmission du VHC à cause de la réutilisation fréquente d'aiguilles et de seringues contaminées ainsi que d'un manque de stérilisation du matériel médical (Frank *et al.*, 2000). Aujourd'hui, on estime qu'en Égypte plus d'une personne sur sept a développé des anticorps anti-VHC et que plus d'une personne sur dix est chroniquement infectée.

En Europe, de manière similaire à ce que l'on observe au niveau mondial, on assiste à un gradient de prévalence croissant du Nord au Sud. A titre d'exemple, l'incidence de cette maladie est de 0,5% en Norvège ou en Suède et atteint 0,9 % en Belgique alors qu'en Turquie ou en Espagne, deux pays bordant la Méditerranée, elle dépasse les 2%.

En ce qui concerne la situation en France, les chiffres récents font état de 1,3% de séropositifs pour le VHC (soit plus de 800 000 personnes) dont 65% sont chroniquement infectées (Lavanchy, 2011).

## b) Modes de contamination

Le VHC se transmet essentiellement par voie parentérale, c'est-à-dire via le sang et ses dérivés. Trois voies majeures de contamination existent : post-transfusionnelle, nosocomiale et via la toxicomanie intraveineuse.

Jusqu'en 1990, la transmission était majoritairement liée à la transfusion de sang contaminé. Ce mode de contamination a significativement régressé dans les pays industrialisés. En effet, des méthodes de préventions efficaces ont été mises en places. Par exemple, les dons de sang sont contrôlés depuis 1990 : dans un premier temps ce sont les méthodes de dépistage de première génération (visant à rechercher la présence d'anticorps anti-VHC dans le sang) qui ont été utilisées et ces méthodes ont évoluées jusqu'au dépistage génomique virale (DGV) mis en place dès 2001 (Alter, 2007; Shepard *et al.*, 2005). Cependant, dans les pays en développement, le manque de moyens freine considérablement le dépistage des donneurs et la transfusion constitue toujours un mode de contamination fréquent.

La transmission nosocomiale est difficile à évaluer mais représente un risque certain. La forte proportion de séropositifs pour le VHC parmi les patients hémodialysés (10 à 33% en fonction des pays) en témoigne d'ailleurs (Lavanchy, 2009). Le rôle joué par les activités de soins dans la transmission du VHC est en voie de diminution dans les pays où les règles d'hygiène et de désinfection du matériel sont strictement respectées. Aussi, le développement du matériel à usage unique permet de tendre vers la réduction de la transmission nosocomiale du virus (Shepard *et al.*, 2005). Mais les pays les plus pauvres sont encore soumis à de forts taux de contamination via les activités de soin, notamment à cause d'un manque de stérilisation et la réutilisation fréquente de matériel souillé. Ce sont d'ailleurs de telles failles qui ont mené à la contamination massive lors de la campagne de traitement contre la schistosomiase en Egypte (Frank *et al.*, 2000).

Le VHC est aussi transmis via l'usage de drogue par voie intraveineuse. Cette voie de transmission est la voie majoritaire dans les pays industrialisés et désormais également dans les pays en développement (Lavanchy, 2009). Le partage d'aiguilles est clairement incriminé, mais des études proposent aussi le partage de matériel annexe

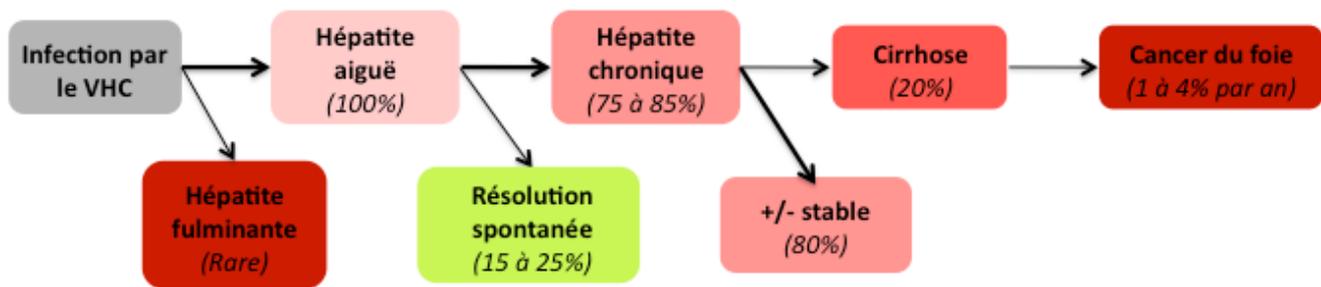
comme vecteur de la transmission (Conry-Cantilena *et al.*, 1996; Thorpe *et al.*, 2002). Malgré des campagnes de prévention visant à sensibiliser les usagers de drogues sur les risques de contaminations virales et la mise en place de mesures préventives, comme par exemple la vente libre de seringues en pharmacie depuis 1987, ce mode de contamination persiste.

D'autres voies de transmission sont recensées. La contamination professionnelle existe mais demeure relativement faible. Elle est souvent due à des piqûres accidentelles avec des aiguilles contaminées. Dans ce contexte, une prise de conscience et des précautions d'hygiène de la part du personnel de santé permettent de réduire les risques. Aussi, des cas de contaminations sexuelles et familiales sont décrites mais restent rares. De la même façon, la transmission mère-enfant est peu fréquente (Alter, 2007; Shepard *et al.*, 2005). On évalue la prévalence d'un tel risque à 5%. A ce jour, les mères infectées par le VHC ne doivent pas nécessairement accoucher par césarienne et aucune contre-indication à l'allaitement n'est délivrée (Indolfi & Resti, 2009). Enfin, des pratiques culturelles ou religieuses particulières telles que la circoncision, l'acupuncture, le tatouage ou le piercing peuvent être les vecteurs de la transmission de VHC dans le cas où le matériel utilisé est mal désinfecté.

Il est intéressant de noter que dans 20% des cas le mode de contamination n'est pas clairement identifié. Le patient peut parfois choisir de dissimuler certaines pratiques ou simplement ne pas connaître l'origine de la contamination.

#### 4. Pathogenèse et évolution de la maladie

L'Hépatite C est une maladie progressive à long terme puisque dans la majorité des cas une évolution sur plusieurs décennies est observée. Ainsi, la personne infectée par le VHC développe dans un premier temps une hépatite dite « aiguë » et, dans environ 80% des cas, l'infection persiste au delà de six mois et aboutit à une hépatite C dite « chronique ». La chronicité évolue alors vers des maladies histologiques du foie clairement identifiées telles que la fibrose, la cirrhose puis le carcinome hépatocellulaire pour 1 à 4% des patients chaque année (**Figure 2**).



**Figure 2 :** Evolution d'une infection causée par le VHC

### a) L'hépatite C aiguë

La quantité de données expérimentales concernant la phase aiguë de l'hépatite C reste limitée et notamment en raison de son caractère souvent asymptomatique. En effet à ce stade, seules environ 25% des personnes infectées développent des symptômes, parmi lesquels certains peuvent être relativement aspécifiques. Pour ces raisons, le diagnostic est difficile et rarement établi à ce stade de la maladie (Grebely *et al.*, 2011; Santantonio *et al.*, 2008).

Le diagnostic de l'hépatite C aiguë est basé sur ces trois points : la détection de l'ARN viral, la séroconversion et l'élévation du taux des transaminases hépatiques.

Après l'exposition au VHC, l'ARN viral devient détectable dans le sang 1 à 3 semaines plus tard. Cette virémie précède de quelques semaines la séroconversion, avec l'apparition d'anticorps spécifiques anti-VHC 7 à 8 semaines après l'infection (Bowen & Walker, 2005; Santantonio *et al.*, 2008). On observe également une élévation du taux des transaminases du foie 2 à 4 semaines après l'infection. L'augmentation de ces enzymes sériques de 10 à 20 fois par rapport au taux normal est en général le premier témoin d'une atteinte hépatique. Dans moins d'un tiers des cas, elle coïncide avec l'apparition de symptômes plus ou moins spécifiques dont les plus courants sont : fatigue, fièvre, nausées, douleurs abdominales, urines foncées et jaunisse (Santantonio *et al.*, 2008).

Parmi les personnes atteintes d'hépatite C aiguë, 15 à 25% sont capables de se débarrasser du virus : on parle alors de guérison spontanée ou de clairance lorsque

l'ARN viral devient indétectable dans le sang (Bowen & Walker, 2005). Les mécanismes précis impliqués dans ce phénomène restent mal connus, mais il semble que des facteurs viraux (génotype, quasi-espèces virales...) et des facteurs propres à l'hôte (sexe, âge...) influencent la guérison. Aussi, bien qu'il n'existe pas de facteur permettant de pronostiquer le devenir d'une hépatite aiguë, il est intéressant de noter que les personnes présentant des symptômes à ce stade de la maladie seraient plus à même d'éliminer le virus, cela en corrélation avec une réponse immunitaire accrue (Santantonio *et al.*, 2008).

Dans 75 à 85% des cas d'hépatite C aiguë, on observe une évolution vers la chronicité, marquée par une virémie qui persiste et se stabilise au delà de six mois après l'infection. Il faut également noter que, aussi rares soient-ils, des cas d'hépatites fulminantes sont décrits (Farci *et al.*, 1996a) (**Figure 2**).

En ce qui concerne le traitement proposé à ce stade de la maladie, les études préconisent une monothérapie d'interféron (IFN) pégylé durant 24 semaines (Grebely *et al.*, 2011). L'administration de ce composé permet en effet de réduire la fréquence des injections par rapport à l'interféron classique et a été montré comme efficace contre l'évolution vers la chronicité au cours de plusieurs travaux (Kamal *et al.*, 2006; Santantonio *et al.*, 2005; Wiegand *et al.*, 2006). La combinaison à la ribavirine, traitement classique contre l'hépatite C chronique, reste controversée quant à une éventuelle amélioration de la réponse au traitement durant le stade aigu de la maladie. Enfin, la date de début de traitement idéale est difficile à établir et, bien qu'il apparaisse qu'un traitement précoce donne de meilleurs résultats, un temps d'observation sans traitement est nécessaire puisqu'une partie des patients atteints d'hépatite C aiguë guérit spontanément. Il s'agit de trouver le bon équilibre entre la possibilité d'éliminer le virus sans thérapie, et ainsi éviter les effets secondaires et les coûts liés à la prise d'interféron, et commencer la médication avant le passage vers la chronicité (Grebely *et al.*, 2011; Loomba *et al.*, 2010).

## **b) L'hépatite C chronique**

Après le développement d'une hépatite aiguë, environ 80% des personnes infectées par le VHC développent une hépatite chronique (**Figure 2**). Ce passage vers la

chronicité est défini comme la persistance de l'ARN du virus dans le sang au delà de six mois.

La plupart du temps, la phase aiguë de la maladie est passée inaperçue et c'est de manière fortuite que l'hépatite C chronique est découverte. En effet, la majorité des patients ne développent pas ou peu de symptômes malgré la progression de la maladie. Le risque de passage vers la chronicité est dépendant de facteurs et d'interactions virus-hôte encore mal connus. Cependant, il est admis par exemple que le sexe masculin et l'âge avancé de l'hôte sont des facteurs qui augmentent ce risque, tout comme l'obésité, la co-infection par le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) ou le VHB et la consommation d'alcool (Chen & Morgan, 2006; Grebely *et al.*, 2011). Certaines études suggèrent que l'évolution vers la chronicité pourrait être dépendante de la multiplication de quasi-espèces virales, favorisant ainsi l'échappement du virus au système immunitaire de l'individu infecté (Farci *et al.*, 2000). A l'inverse, des études d'infection sur le chimpanzé ont montré un passage de la maladie vers la chronicité, associée à pas ou peu d'évolution des quasi-espèces virales (Major *et al.*, 1999).

Au cours de la transition du stade aigu au stade chronique, la virémie ainsi que le taux de transaminases hépatiques dans le sang peuvent varier mais finissent par se stabiliser. La quantité d'ARN viral atteint alors un plateau en général inférieur à la virémie de la phase aiguë de l'hépatite. On estime que  $10^{12}$  nouveaux virions par jour sont produits chez l'individu infecté. Les symptômes décrits par les patients à ce stade sont plus ou moins passagers et variables, le plus commun étant la fatigue (Hoofnagle, 2002).

L'hépatite C chronique est une maladie progressive à long terme. Sur plusieurs décennies après la contamination, l'infection induit des dommages irréversibles au foie. Cela en fait d'ailleurs la cause majeure de transplantation hépatique en Europe et aux Etats-Unis puisque chez une partie des patients, la maladie évolue vers une cirrhose décompensée ou un hépatocarcinome qui altèrent le bon fonctionnement du foie (Poynard *et al.*, 2003). Malheureusement, les bienfaits de la transplantation chez les patients atteints d'hépatite C ne sont que de courte durée étant donné que le virus réinfecte systématiquement le greffon sain dans les 5 ans qui suivent la transplantation (Rubín *et al.*, 2011). Les atteintes causées au foie sont indirectement dues au VHC : le

virus est non-cytopathique et c'est la réponse du système immunitaire de l'hôte qui entraîne la destruction des cellules hépatiques. Il semble en effet que la réponse immunitaire engagée soit assez forte pour détruire les cellules et entraîner la fibrose du tissu, mais insuffisamment efficace pour éradiquer le virus (Heydtmann *et al.*, 2001). L'évolution vers la fibrose hépatique est variable mais fréquente et constitue une première étape vers la cirrhose. Les études montrent qu'environ 20% des patients atteints d'hépatite C chronique développeront une cirrhose dans les 20 ans suivant l'infection. Le stade cirrhose peut être asymptomatique et donc ne pas altérer la qualité de vie du patient, jusqu'à l'apparition d'une éventuelle décompensation ou d'un carcinome hépatocellulaire. Le risque de développer un cancer du foie est estimé à 1 à 4% par an (Chen & Morgan, 2006; Hoofnagle, 2002) (**Figure 2**). Quant à la cirrhose décompensée, elle fait chuter le taux de survie à 5 ans de 91 à 50% par rapport à une cirrhose compensée. C'est dans ce contexte que la biopsie reste largement pratiquée en tant que méthode de choix afin d'observer le foie d'un point de vue histologique et ainsi déterminer l'avancement de la maladie (Ascione *et al.*, 2007).

Le lien entre le VHC et le cancer du foie est illustré par l'incidence vingt fois plus élevée des carcinomes hépatocellulaires chez les sujets infectés par le VHC par rapport à des sujets séronégatifs. Aussi, il semble que le développement de thérapies contre l'hépatite C impacte l'incidence d'apparition des ces carcinomes. Malgré tout, l'absence de vaccin conduira encore à de nombreux cas de carcinomes post-hépatite C (Kwon & Lok, 2011; Tinkle & Haas-Kogan, 2012) et le mécanisme liant l'infection par le VHC au développement d'un carcinome hépatocellulaire n'est pas clairement défini. Le génome du virus ne s'intègre pas à celui de la cellule mais des pistes sont régulièrement proposées, incriminant notamment le stress oxydatif et l'inflammation liés à la réponse immunitaire (Castello *et al.*, 2010). Aussi, de manière plus directe, des interactions entre protéines virales et cellulaires initieraient la transformation des cellules hépatiques (Levrero, 2006). Par exemple, la protéine virale Core a largement été étudiée et interfère avec de nombreuses voies de signalisation et notamment celles impliquées dans les mécanismes de croissance cellulaire et d'apoptose (Stephen L Chen, 2006).

### c) Les manifestations extra-hépatiques

Lorsque l'infection par le VHC persiste, elle peut s'accompagner de symptômes extra-hépatiques plus ou moins sévères, qui touchent de nombreux organes en dehors du foie : peau, yeux, cerveau, reins, thyroïde... (Craxi *et al.*, 2008; Galossi *et al.*, 2007). Le VHC présente un tropisme préférentiel pour les cellules hépatiques, mais d'autres cellules de l'organisme pourraient avoir un rôle de réservoir pour le virus. Notamment, plusieurs études présentent la possibilité pour le VHC d'infecter les tissus cérébraux (Fletcher & McKeating, 2012) et les cellules lymphocytaires (Ito *et al.*, 2011). D'ailleurs, des désordres cérébraux peuvent être observés chez les patients atteints d'hépatite C et la manifestation extra-hépatique la plus fréquente est la cryoglobulinémie, une maladie ayant pour origine un désordre de prolifération des cellules B lymphocytaires. Elle est retrouvée chez 20 à 50% des patients et se caractérise par la production de cryoglobulines, des immunoglobulines (Ig) anormales qui précipitent à une température inférieure à 37°C. Cette maladie est une vascularite systémique, c'est-à-dire qu'elle touche tous les vaisseaux de l'organisme et peut entraîner des complications systémiques, le plus souvent articulaires, cutanées et neurologiques. L'interféron est efficacement utilisé depuis plusieurs années pour traiter cette maladie, bien que dans certains cas, les symptômes se soient vus aggravés par la prise du traitement. Toutefois, le bilan d'une réunion récente d'experts du milieu médical recommande le traitement antiviral classique (interféron pégylé et ribavirine) pour traiter les patients atteints de cryoglobulinémie induite par le VHC, avec une surveillance stricte de l'évolution des symptômes extra-hépatiques (Pietrogrande *et al.*, 2011).

## 5. Les méthodes de diagnostic

Le diagnostic de l'hépatite C est difficile à établir puisque une majorité de patients ne présente pas de symptôme dans les premiers temps de la maladie et qu'une fois présents, ces symptômes peuvent être relativement aspécifiques. C'est pourquoi le diagnostic n'est que rarement établi durant la phase aiguë et souvent posé tardivement et de manière fortuite. En effet, c'est souvent par hasard, lors d'un contrôle médical de routine par exemple (palpations abdominales, biopsie hépatique, sérologie des transaminases du foie...) que la maladie est soupçonnée. Quoi qu'il en soit, afin d'établir

le diagnostic d'une hépatite C, trois indicateurs peuvent actuellement être recherchés : les anticorps anti-VHC, l'antigène de capsidite et l'ARN viral.

#### a) Outils de diagnostic indirects

En général, le premier diagnostic s'appuie sur la recherche d'anticorps dirigés contre le VHC dans le sérum des patients. Les tests biologiques utilisés sont basés sur des réactions antigènes-anticorps, permises par la fixation d'antigènes viraux sur un support accueillant ensuite l'échantillon sérologique du patient. Ces méthodes sont appelées EIAs<sup>1</sup>. La séroconversion a lieu environ 7 à 8 semaines après l'exposition au VHC et c'est donc à partir de cette période que les anticorps sont détectables par les EIAs. Par le passé, une seconde confirmation par immunoblot était essentielle mais depuis l'amélioration de la sensibilité des tests de nouvelle génération, ils sont devenus obsolètes et ne sont plus nécessaires (Chevaliez & Pawlotsky, 2007).

Un test efficace et plus rapide a récemment été approuvé en Europe. Il est également basé sur une reconnaissance antigènes viraux-anticorps mais permet d'obtenir un résultat en 20 minutes environ, avec une lecture simplifiée du résultat à la manière de celui d'un test de grossesse. De plus, il s'est montré efficace dans l'établissement du diagnostic à partir de plusieurs fluides corporels : en testant des échantillons de sang, sérum ou plasma des patients, mais aussi après récolte de sang suite à une simple piqure du doigt ou encore par le biais d'un prélèvement de salive (Lee *et al.*, 2011).

Puisque la séroconversion a lieu plusieurs semaines après l'infection et afin d'accélérer le diagnostic d'une infection récente, de nouvelles possibilités sont étudiées. La détection de l'antigène viral de capsidite couplée à la détection d'anticorps anti-VHC semble améliorer la précocité du diagnostic (Laperche *et al.*, 2005). L'efficacité d'un test optimisé basé sur ce principe est démontrée dans une étude récente d'Alzahrani et collaborateurs (Alzahrani, 2008). La protéine de capsidite étant détectable plus précocement dans le sérum que les anticorps dirigés contre le virus, ce test permet d'établir le diagnostic avant même la séroconversion.

---

<sup>1</sup> *Enzyme Immunoassays*

## b) Outils de diagnostic directs

Le premier marqueur détectable dans le sang des patients est l'ARN viral. Afin de le rechercher chez un patient, le sérum est prélevé et soumis à des tests de biologie moléculaire qualitatifs, comme la RT-PCR<sup>2</sup> ou la TMA<sup>3</sup>, ou quantitatifs, tels que la PCR<sup>4</sup> en temps réel ou la technique de bDNA<sup>5</sup>. Ces techniques permettent d'amplifier le génome viral (techniques de PCR, TMA) ou le signal associé à la détection de l'ARN viral (bDNA) (Pawlotsky, 2002).

Une technique récente ne nécessitant pas d'étape d'amplification de l'ARN viral a été décrite. Ce système met en jeu des nanoparticules d'or et des sondes spécifiques au génome du VHC et permet de différencier l'absence et la présence d'ARN viral dans l'échantillon grâce à une réaction colorimétrique. C'est une technique relativement sensible et plus rapide que celles nécessitant l'amplification du génome viral (Shawky *et al.*, 2010).

Afin de diagnostiquer la maladie, la recherche d'anticorps puis d'ARN viral est effectuée. Ces analyses peuvent donner différents résultats :

- *absence d'anticorps anti-VHC et présence d'ARN*. Le diagnostic est celui d'une hépatite C aiguë et sera à confirmer quelques semaines plus tard avec la séroconversion.

- *présence d'anticorps et d'ARN viral*. La séroconversion a eu lieu et le génome viral est présent donc l'individu est atteint d'hépatite C. Il est difficile de savoir s'il s'agit d'une phase aiguë avancée ou si la chronicité est déjà atteinte.

- *présence d'anticorps et absence d'ARN viral*. Deux scénarios sont possibles dans ce cas : soit le patient a été infecté par le VHC dans le passé et a guéri spontanément, soit il est infecté mais l'ARN est temporairement indétectable, ce qui arrive notamment lors de la transition vers la chronicité. Ce diagnostic nécessite donc que le test visant à rechercher la présence d'ARN viral soit effectué une seconde fois quelques semaines plus tard.

---

<sup>2</sup> *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*

<sup>3</sup> *Transcription-Mediated Amplification*

<sup>4</sup> *Polymerase Chain Reaction*

<sup>5</sup> *branched-Deoxyribonucleic Acid*

## 6. La réponse immunitaire anti-VHC

Lorsqu'un virus pénètre dans l'organisme, ce dernier met en action des mécanismes de défense visant à se débarrasser de l'agent infectieux. C'est donc le cas lorsque le VHC infecte un individu. Dans un premier temps, ce sont les déterminants de l'immunité innée qui sont mis en jeu, avec comme grands acteurs les cellules Natural Killer (NK) et l'IFN, puis les effecteurs de l'immunité adaptative avec notamment les lymphocytes B (LB) et les lymphocytes T (LT) dont l'activation est responsable des immunités respectivement dites humorale et cellulaire. La qualité de la réponse immunitaire joue un rôle important dans la résolution spontanée ou la persistance de l'infection virale.

### a) L'immunité innée

Les mécanismes de l'immunité innée sont mis en action une à deux semaines après l'exposition au VHC. Cette immunité non-spécifique passe principalement par l'activation des cellules NK et la production d'IFN de type 1.

La première réponse est la sécrétion d'INF- $\beta$  par les cellules infectées. Ce mécanisme est permis grâce à l'engagement de deux récepteurs : TLR<sup>6-3</sup> et RIG-I<sup>7</sup>. Ils reconnaissent des composants du virus, appelés PAMPs<sup>8</sup>. Plus précisément, RIG-I est une protéine cytosolique capable de reconnaître des régions structurées des extrémités 5' et 3' non-codantes du génome viral, alors que TLR-3 est un senseur membranaire situé au niveau des endosomes et qui reconnaît l'ARN double brin. La liaison des PAMPs aux récepteurs active des voies de signalisation intracellulaires menant à la production d'INF- $\beta$ . L'IFN ainsi produit génère un état antiviral non-spécifique au sein de la cellule infectée, mais va également activer des voies de signalisation dans les cellules voisines non encore infectées. Brièvement, l'IFN est reconnu par des récepteurs spécifiques à la surface des cellules et engage l'activation de la voie JAK/STAT<sup>9</sup>. Cela mène à l'induction de gènes impliqués dans la réponse antivirale, la réponse inflammatoire ou encore la

---

<sup>6</sup> *Toll-Like Receptor*

<sup>7</sup> *Retinoic acid-Inducible Gene-1*

<sup>8</sup> *Pathogen-Associated Molecular Patterns*

<sup>9</sup> *Janus Kinase / Signal Transducers and Activators of Transcription*

dégradation des protéines (Feld & Hoofnagle, 2005; Rehermann, 2009). De manière intéressante, l'importance de la signalisation via l'IFN dans le contrôle de l'infection est illustrée par le fait que les cellules Huh-7, d'origine hépatique et qui permettent la réplication du VHC, sont déficientes dans la voie de signalisation issue de TLR-3 (Li *et al.*, 2005a). De la même façon, les cellules de la lignée Huh-7.5, sous-clone de la lignée Huh-7, présentent une mutation au niveau de la protéine RIG-I (Sumpter *et al.*, 2005). En 2002, Su et collaborateurs ont analysé l'expression des gènes à partir de biopsies de chimpanzés infectés par le VHC et ont montré que les gènes induits par l'IFN sont bien exprimés lors de l'infection, mais ne suffisent pas à éliminer le virus (Su *et al.*, 2002).

Le VHC met en place différents mécanismes afin de contrer l'effet antiviral de l'IFN et ce via plusieurs protéines virales (Gale & Foy, 2005; Rehermann, 2009). Ainsi NS5A, l'une des protéines non-structurales du VHC impliquée dans la réplication du génome, et la glycoprotéine d'enveloppe E2 ont été montrées comme capables de perturber la réponse antivirale liée à l'ARN bicaténaire en bloquant l'activité de la PKR<sup>10</sup>. De manière intéressante, la protéine E2 de génotype 1 inhibe plus efficacement l'activité de la PKR que les protéines E2 de génotypes 2 et 3, génotypes qui répondent mieux à la thérapie IFN (Kriegs *et al.*, 2009; Taylor *et al.*, 1999). NS5A conduit également à la production d'Interleukine (IL)-8, cette chimiokine pro-inflammatoire interférant avec la réponse antivirale liée à l'IFN (Polyak *et al.*, 2001). Aussi, l'expression de la protéase virale NS3/4A interfère avec les voies de signalisation médiées par RIG-I et TLR-3 (Breiman *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2009). Enfin, il a aussi été montré que la protéine de capside a une action inhibitrice sur la voie JAK/STAT, avec un rôle antagoniste à celui de l'IFN- $\alpha$  (Bode *et al.*, 2003).

Les cellules NK jouent aussi un rôle très important dans l'immunité innée mais également dans l'établissement de la réponse adaptative. En effet, ces cellules possèdent des fonctions cytotoxiques et produisent des cytokines, ce qui leur permet de détruire directement les cellules infectées mais aussi de contrôler le virus via les molécules antivirales produites. Une étude suggère que l'altération de l'activité des cellules NK pourrait jouer un rôle dans la persistance virale : des glycoprotéines d'enveloppe E2 recombinantes du virus conduisent à l'altération du fonctionnement des cellules NK en se liant aux molécules de CD81 présentes à leur surface (Tseng & Klimpel, 2002).

---

<sup>10</sup> *Protein Kinase R*

Cependant, dans une étude plus récente, les auteurs ont vérifié cette hypothèse en utilisant du virus infectieux produit en culture cellulaire et les résultats ne confirment pas ceux de l'étude précédente (Yoon *et al.*, 2009).

En plus de constituer une première ligne de défense contre le virus, le système immunitaire inné établi le lien avec l'immunité adaptative, notamment via la production rapide et massive de cytokines qui activent les cellules dendritiques et autres cellules présentatrices d'antigènes.

## **b) L'immunité adaptative**

L'immunité adaptative, seconde ligne de défense contre les pathogènes, intervient plus tardivement que l'immunité innée. L'immunité adaptative combat l'infection par deux mécanismes : la réponse cellulaire, qui implique le développement de LT spécifiques du VHC, et la réponse humorale, avec l'apparition d'anticorps anti-VHC produits par les LB. L'immunité cellulaire entre en jeu environ 4 à 8 semaines post-infection alors que la réponse humorale devient détectable avec la séroconversion 8 à 20 semaines après l'infection (Brenndörfer & Sällberg, 2012; Rehermann, 2009).

### **❖ *La réponse cellulaire :***

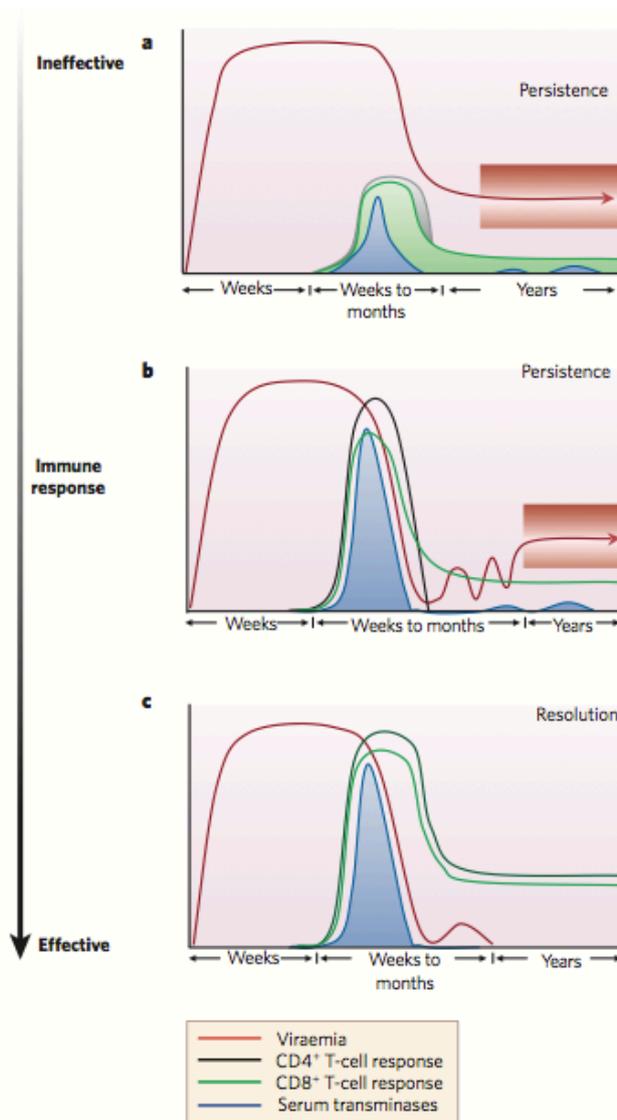
Deux types cellulaires sont principalement mis en jeu dans le processus d'immunité cellulaire : les LT auxiliaires CD4+ et LT cytotoxiques CD8+. Ce sont les cytokines produites par les effecteurs de l'immunité innée qui stimulent les cellules présentatrices d'antigènes, dont les cellules dendritiques, et ainsi initient la mise en action de cette immunité adaptative cellulaire. L'importance de cette réponse cellulaire est tout d'abord illustrée par la chute de la virémie associée à l'établissement des réponses CD4+ et CD8+ (**Figure 3**).

La réponse CD4+ est détectable dans le sang 3 à 4 semaines après l'exposition au VHC. La qualité de cette réponse est directement corrélée à la clairance du virus. En effet, plusieurs études démontrent qu'une réponse CD4+ rapide, intense et soutenue est associée à l'élimination du virus au cours de la phase aiguë de la maladie. A l'inverse, le passage vers la chronicité est corrélé à une réponse CD4+ faible, retardée ou transitoire

(Aberle *et al.*, 2006; Gerlach *et al.*, 1999; Rosen *et al.*, 2002; Urbani *et al.*, 2006). Il semble aussi que la clairance soit associée à une réponse CD4+ de type TH1 (production d'IFN- $\gamma$  et d'IL-2) alors qu'un profil TH2 (sécrétion d'IL-4 et IL-10) conduirait plutôt vers la chronicité (Tsai *et al.*, 1997). La multi-spécificité de la réponse CD4+ est également importante. Il a été montré que la réponse cellulaire CD4+ est dirigée principalement contre les protéines non structurales (Hoffmann *et al.*, 1995) et les résultats d'une étude de Day et collaborateurs indiquent que, chez les patients ayant éliminés le virus, la diversité des épitopes spécifiques du VHC ciblés par les cellules T CD4+ est plus importante par rapport aux patients chez qui l'infection devient chronique (Day *et al.*, 2002).

Concernant la réponse médiée par les LT CD8+, il apparaît là encore qu'une réponse intense et multi-spécifique agisse en faveur de la clairance du virus (Cooper *et al.*, 1999; Lechner *et al.*, 2000). La localisation des épitopes ciblés par ces cellules joue un rôle important dans le devenir de l'infection (Ward *et al.*, 2002). La sélection d'épitopes situés dans les protéines virales NS3 et NS5B favorise d'ailleurs l'élimination du virus. Les LT CD8+ contribuent au contrôle de l'infection par des mécanismes cytolytiques visant à détruire les cellules infectées mais aussi non cytolytiques, via notamment la sécrétion des cytokines (Thimme, 2001). La résolution de l'infection corrèle avec le nombre de LT CD8+ spécifiques du VHC dans les six mois suivant l'infection (Grüner *et al.*, 2000). Au cours de l'établissement de la chronicité chez les patients, un contexte d'équilibre s'établit entre la réponse CD8+ de l'hôte et la réplication virale (**Figure 3**).

La contribution précise des cellules CD4+ et CD8+ dans le contrôle de l'infection est encore mal connue. Cependant, il semble clair que ces réponses soient toutes les deux importantes dans le devenir de l'infection (Bowen & Walker, 2005). Des études réalisées sur des chimpanzés ayant résolu une première infection au VHC l'illustrent : la déplétion en LT CD4+ ou en LT CD8+ est associée à la persistance chronique du virus lors d'une nouvelle infection (Grakoui *et al.*, 2003; Shoukry *et al.*, 2003). Egalement, l'absence de réponse CD4+ entraîne l'émergence de mutants qui échappent à la réponse CD8+ (Grakoui *et al.*, 2003) et des dysfonctionnements relatifs à la prolifération, la cytotoxicité ou la capacité sécrétoire des cellules CD8+ sont associés à l'échappement du virus à la réponse immunitaire (Neumann-Haefelin *et al.*, 2005). Deux réponses cellulaires efficaces sont donc nécessaires afin d'éliminer le virus.



**Figure 3: Représentation schématique de la réponse immunitaire cellulaire au cours de l'infection par le VHC**

(a) La virémie (courbe rouge) augmente rapidement et, bien qu'elle diminue après le pic initial, elle n'est jamais contrôlée. Il s'ensuit l'établissement d'une infection chronique avec une virémie variable chez les différents patients. Dans ces conditions, les réponses CD4+ et CD8+ (courbes noire et verte respectivement) ainsi que le niveau des transaminases sériques (courbe bleue) évoluent peu et peuvent être faibles, voire absentes. Les courbes pleines indiquent que les réponses peuvent être variables chez les différents patients. (b) La virémie persiste pendant plusieurs semaines en absence de réponse immunitaire cellulaire détectable. L'apparition des réponses CD4+ et CD8+ est associée à un contrôle temporaire de la virémie ainsi qu'à des variations du niveau des transaminases sériques. Toutefois, après la chute de la réponse CD4+, la virémie réapparaît et devient persistante. Une réponse CD8+ peut rester détectable malgré l'infection chronique. (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 CD4+ et CD8+ qui coïncide souvent avec un niveau de transaminases sériques variable. Un rebond de la virémie peut avoir lieu avant la clairance virale.

### ❖ La réponse humorale :

Plusieurs semaines après l'infection, des anticorps dirigés contre les protéines structurales et non-structurales du VHC deviennent détectables dans le sérum des patients. Parmi eux, une faible proportion est neutralisante mais la majorité ne l'est pas. Les études sur les anticorps neutralisants ont longtemps été freinées par la difficulté de propager le VHC en culture cellulaire. C'est grâce au développement du système des particules virales pseudotypées par les glycoprotéines d'enveloppe du VHC (VHCpp) que les recherches ont pu avancer dans ce domaine (Bartosch *et al.*, 2003b, c; Hsu *et al.*, 2003; Lavillette *et al.*, 2005b). Les anticorps neutralisants ciblent les glycoprotéines d'enveloppe exprimées à la surface du virus. Plus précisément, la région HVR1<sup>11</sup> de E2

<sup>11</sup> Hypervariable Region 1

est particulièrement immunogène, mais les anticorps la ciblant sont souvent spécifiques d'un nombre limité de quasi-espèces virales (Farci *et al.*, 1996b). Cependant, des études décrivent des anticorps neutralisants à large spectre, c'est-à-dire ciblant d'autres régions (Keck *et al.*, 2007; Meunier *et al.*, 2005). Il semblerait qu'en fait, la production d'anticorps neutralisants cible majoritairement HVR1 dans les premiers temps de l'infection alors que les anticorps neutralisants à plus large spectre n'apparaissent que plus tardivement dans l'établissement de la réponse immunitaire (Hahn *et al.*, 2007).

Le rôle des anticorps neutralisants dans le devenir de l'infection, c'est-à-dire guérison spontanée ou chronicité, est controversé. Plusieurs études présentent des arguments en faveur d'un rôle protecteur des anticorps neutralisants contre la persistance virale. Notamment, lors d'études menées sur des chimpanzés, les anticorps neutralisants ont pu bloquer l'infection par le VHC (Farci *et al.*, 1994). De plus, un travail de vaccination de chimpanzés avec les glycoprotéines d'enveloppe du VHC met en évidence l'importance de la séroconversion dans la clairance du VHC (Choo *et al.*, 1994). Aussi, il semble que la diversité de séquence dans la région HVR1 de E2 soit corrélée avec la persistance de l'infection (Farci *et al.*, 2000). Enfin, il a été montré que la clairance du virus est associée à une induction rapide d'anticorps neutralisants dans la phase précoce de l'infection (Lavillette *et al.*, 2005a; Pestka *et al.*, 2007).

Cependant, des arguments contre un effet protecteur des anticorps neutralisants persistent. Par exemple, des cas de résolution spontanée sans séroconversion ont été décrits, chez l'Homme et le chimpanzé (Logvinoff *et al.*, 2004; Post *et al.*, 2004). Aussi, chez la majorité des patients chroniquement infectés, on retrouve des anticorps neutralisants. Plusieurs études apportent des explications possibles de la cohabitation du virus avec des anticorps neutralisants. Tout d'abord, le virus circule dans l'organisme sous forme de quasi-espèces virales, ce qui lui permet de se protéger contre la réponse immunitaire humorale (Farci *et al.*, 1996b). Aussi, les lipoprotéines de faible densité (LDL<sup>12</sup>) associées au virus pourraient le protéger des anticorps neutralisants (Andre *et al.*, 2002; Maillard *et al.*, 2006). Les lipoprotéines de haute densité (HDL<sup>13</sup>) peuvent aussi contribuer à l'échappement du virus aux anticorps neutralisants et notamment en accélérant le processus d'entrée (Voisset *et al.*, 2006). De plus, il a été montré, grâce au système VHCpp mais aussi dans le contexte de particules virales produites en culture

---

<sup>12</sup> *Low Density Lipoprotein*

<sup>13</sup> *High Density Lipoprotein*

cellulaire (VHCcc), que certains glycanes présents sur la glycoprotéine d'enveloppe E2 protège le VHC contre les anticorps neutralisants (Falkowska *et al.*, 2007; Helle *et al.*, 2007; 2010). Enfin, l'attachement d'anticorps non neutralisants aux particules virales pourrait bloquer l'accès aux anticorps neutralisants et ainsi protéger le virus (Zhang *et al.*, 2007).

#### ❖ *L'existence d'une mémoire immunologique :*

Une première hépatite C résolue semble protéger l'hôte contre la persistance d'une nouvelle infection par le VHC. En effet, des études menées sur des chimpanzés guéris d'une première infection montrent que, bien qu'une virémie relativement faible soit détectable, la durée de l'infection est raccourcie et le virus éliminé rapidement (Lanford *et al.*, 2004; Nascimbeni *et al.*, 2003). Cette protection n'est pas liée à une réponse humorale mais plutôt à une réponse cellulaire CD4+ et CD8+ (Bassett, 2001; Farci *et al.*, 1992). D'ailleurs, au contraire des cellules T mémoires qui restent détectables plusieurs décennies après l'infection chez les patients qui ont résolu l'hépatite C, la sérologie anti-VHC devient indétectable quelques années après l'infection (Takaki *et al.*, 2000). Les cellules T CD4+ et CD8+ sont conjointement impliquées dans cette mémoire immunologique étant donné que la déplétion de l'un ou l'autre de ces types cellulaires induit une persistance virale chez les chimpanzés réinfectés (Grakoui *et al.*, 2003; Shoukry *et al.*, 2003). Ces études réalisées en modèle animal corrélerent avec le résultat d'un travail montrant que la réinfection, chez des toxicomanes ayant une première fois éliminé le virus, entraîne une virémie plus faible que celle détectée chez les primo-infectés (Stephen L Chen, 2006). Cette notion de mémoire immunologique attribuée aux cellules T reste cependant controversée, notamment aux vues des cas de patients et de chimpanzés réinfectés par le VHC et chez qui cette nouvelle infection persiste et devient chronique (Bukh *et al.*, 2008; Lai *et al.*, 1994).

## 7. Les thérapies

Bien que l'ultime but pour lutter contre l'hépatite C soit la prévention, il n'existe pour l'instant pas de vaccin pour combattre cette maladie. Cependant, un traitement existe. La bithérapie standard mise en place depuis la fin des années 1990 a été

améliorée au cours du temps et évolue, depuis 2011, vers une trithérapie. En effet, il y a une grande nécessité à trouver de nouvelles molécules anti-VHC puisque que le traitement classique basé sur l'administration d'IFN- $\alpha$  pégylé et de ribavirine (RBV) présente une efficacité limitée et de nombreux effets secondaires.

### a) La bithérapie

L'utilisation de l'IFN- $\alpha$  dans le traitement contre l'hépatite C remonte à 1984, c'est-à-dire avant même l'identification de l'agent responsable de la maladie (Hoofnagle *et al.*, 1986). En effet, un défaut de production d'IFN avait été identifié chez les patients atteints d'hépatite chronique. L'IFN apporté de manière exogène à l'organisme agit de la même façon que l'IFN endogène, à savoir en diminuant la virémie, en favorisant la cytotoxicité qui vise à détruire les cellules infectées et en établissant un état antiviral atteignant les cellules non infectées (Feld & Hoofnagle, 2005).

Deux améliorations majeures ont permis d'augmenter l'efficacité du traitement par l'IFN- $\alpha$  : l'association à la RBV et la pégylation de la molécule.

La RBV est un analogue nucléosidique de la guanosine. Cette molécule présente une activité antivirale sur de nombreux virus et a été associée à l'IFN dans le traitement contre le VHC à la fin des années 1990 (Feld & Hoofnagle, 2005). En monothérapie, elle permet de diminuer le taux de transaminases du foie mais n'a pas d'effet sur la virémie. Par contre, administrée en bithérapie, son effet est synergique à celui de l'IFN- $\alpha$ . Le mécanisme d'action de la RBV n'est pas clairement défini mais il semble qu'elle agisse de manière directe et indirecte sur le cycle viral (Lau, 2002). En effet, plusieurs rôles lui sont attribués dont l'altération de l'équilibre de la réponse CD4+ en faveur de la voie TH1, la déplétion des stocks de GTP<sup>14</sup> essentiels à une réplication efficace du virus et un blocage de l'initiation de la traduction du génome viral (Galmozzi *et al.*, 2012). Elle agirait donc en couplant un effet immunomodulateur à un effet antiviral direct (Feld & Hoofnagle, 2005).

La pégylation de l'IFN- $\alpha$  a également considérablement amélioré la bithérapie. Ce couplage de l'IFN à une molécule de polyéthylène-glycol (PEG) permet en effet de rallonger considérablement sa demi-vie plasmatique, rendant le traitement plus confortable avec un nombre d'injections chaque semaine qui passe de trois à un.

---

<sup>14</sup> *Guanosine triphosphate*

Cette bithérapie de PEG-INF- $\alpha$  couplée à la RBV permet d'obtenir une réponse virologique soutenue (c'est-à-dire une virémie indétectable dans les 6 mois suivant la fin du traitement) qui varie en fonction des génotypes. De la même façon, la durée du traitement varie en fonction de la souche virale. Ainsi, les patients infectés par des souches de génotype 2 ou 3 sont en général traités durant 6 mois et éliminent le virus dans 80% des cas, alors que la durée du traitement dans le cas des génotypes 1, 4, 5 et 6 est souvent plus proche de 12 mois avec une efficacité limitée à 40-50% des patients ((Poynard *et al.*, 2003)). Aussi, un inconvénient majeur de cette thérapie est lié à l'intensité, la diversité et la fréquence des effets secondaires (symptôme grippal, nausées, dépression, perte d'appétit...). Ces effets indésirables sont tels qu'ils peuvent entraîner une contre-indication de ce traitement pour certains patients ou son arrêt chez des personnes l'ayant débuté mais ne le tolérant pas.

## **b) Les nouvelles molécules**

Aux vues des chiffres concernant l'efficacité de la bithérapie actuelle notamment sur les génotypes 1, 4, 5 et 6 et en conscience du nombre important d'effets secondaires liés à ce traitement, il est urgent de trouver de nouvelles molécules thérapeutiques. Dans cette optique, deux nouveaux agents antiviraux sont sur le marché depuis peu et d'autres sont en phase d'étude clinique.

### **❖ *Télaprévir et bocéprévir : la première trithérapie***

Le télaprévir et le bocéprévir, deux molécules anti-VHC, ont été approuvés par la FDA<sup>15</sup> aux Etats-Unis en mai 2011 et quelques semaines plus tard en Europe par la EMA<sup>16</sup>. Ils viennent en complément de la bithérapie (PEG-INF- $\alpha$  et RBV) dans le traitement contre le VHC pour les patients infectés par des souches virales de génotype 1. Dans l'histoire du VHC, ces molécules sont les premières à être utilisées en thérapie en tant que composés à action antivirale directe. En effet, ils sont tous deux dirigés contre la protéine virale NS3, bloquant son activité protéasique (Reesink *et al.*, 2006; Poordad *et al.*, 2011). Le télaprévir et le bocéprévir augmentent significativement le nombre de répondeurs au traitement, avec des chiffres passant par exemple de 40% de cas de

---

<sup>15</sup> Food and Drug Administration

<sup>16</sup> European Medicines Agency

réponse virologique soutenue avec la bithérapie à 70% avec la trithérapie chez des patients traités pour la première fois. De plus, pour environ un quart des patients, l'efficacité de la trithérapie permet de réduire la durée du traitement.

Malgré l'avancée considérable effectuée grâce à ces deux antiviraux, des problèmes subsistent. Tout d'abord, ces composés ne peuvent pas être administrés en monothérapie puisque des virus résistants apparaissent rapidement. C'est le cas après seulement 14 jours de traitement chez la majorité des patients traités avec le télaprévir (Reesink *et al.*, 2006). Cela implique l'absolue nécessité d'associer ces antiviraux à l'IFN et la RBV, excluant du traitement les patients ne supportant déjà pas la bithérapie. Aussi, les effets secondaires associées à la trithérapie sont exacerbés et enfin, cette thérapie n'a été approuvée que dans le cas d'une infection par une souche de génotype 1 (Salloum & Tai, 2012).

#### ❖ *Molécules en cours d'essai clinique*

##### ***De nouveaux IFN :***

Un premier moyen d'améliorer le traitement contre l'hépatite C est de rendre la bithérapie actuelle plus efficace. Pour cela par exemple, l'albuféron- $\alpha$  (ou albinterféron- $\alpha$ ) a été développé et est en phase III d'étude clinique. Il s'agit d'une molécule d'IFN- $\alpha$  fusionnée à l'albumine humaine afin de la rendre plus stable que le PEG-IFN- $\alpha$  utilisé actuellement. Cette molécule permet d'espacer les injections tout en obtenant un résultat similaire à celui obtenu avec le PEG-IFN- $\alpha$  (Zeuzem *et al.*, 2008).

En 2009, il a été montré qu'un polymorphisme à proximité du gène IL-28B est impliqué dans la réponse au traitement par bithérapie (Stephen L Chen, 2006). Ce gène encode l'IFN- $\lambda$ , un IFN de type 3 qui, malgré sa liaison à un récepteur différent, induit des voies de signalisation communes à celles de l'IFN- $\alpha$ . Cet IFN- $\lambda$  semble présenter moins de toxicité que l'IFN- $\alpha$  couramment utilisé. D'ailleurs, une étude clinique de phase II indique que, en combinaison à la RBV, ce nouvel IFN présente les mêmes résultats que l'IFN- $\alpha$  mais associé à des effets secondaires moindres (Schaefer & Chung, 2012).

Etant donné les effets indésirables liés à l'administration d'IFN, l'un des buts à long terme serait de définir un protocole de traitement sans IFN. Pour cela, il faudrait combiner des molécules antivirales inhibant plusieurs cibles, virales et/ou cellulaires.

### ***Les molécules antivirales directes :***

Le cycle viral étant de mieux en mieux connu, des cibles thérapeutiques majeures ont été identifiées. Parmi ces cibles intéressantes, NS3/4B, NS5B et NS5A sont les principales. Plusieurs inhibiteurs de ces protéines virales sont actuellement en phase II ou III d'étude clinique (**Tableau 1**). Par exemple les composés TMC-435 et BI 201335, inhibiteurs de la protéase virale NS3, sont actuellement en phase III de test clinique en combinaison avec le PEG-IFN- $\alpha$  et la RBV. Ils semblent présenter une meilleure efficacité et une toxicité moindre en comparaison de la trithérapie incluant le bocéprévir ou le télaprévir (Dore, 2012; Schaefer & Chung, 2012). Concernant NS5B, l'ARN polymérase ARN-dépendante du virus, plusieurs inhibiteurs sont à l'étude, à l'image de la mericitabine actuellement en phase II d'étude clinique (Membreno & Lawitz, 2011; Varshney *et al.*, 2012). Enfin, et de manière non exhaustive, il est intéressant de parler du daclastavir, un inhibiteur de NS5A, protéine virale au rôle encore mal défini mais importante pour la réplication virale. Cette molécule, actuellement en test clinique de phase III, présente un intérêt particulier dans la recherche d'une thérapie sans IFN. En effet, un équipe japonaise a étudié la combinaison du daclastavir avec un inhibiteur de NS3 en phase II d'étude clinique à ce jour, l'asunaprévir. Les auteurs montrent ainsi que l'administration de deux antiviraux, sans association à l'IFN ou à la RBV, peut aboutir à une réponse virologique soutenue chez des patients, en l'occurrence ici infectés par des souches de génotype 1b et non-répondeurs à la bithérapie classique (Chayama *et al.*, 2011).

### ***Les molécules ciblant des facteurs cellulaires :***

En tant que parasite obligatoire, le VHC sollicite de nombreuses molécules cellulaires au cours de son cycle viral. Cibler ces molécules de l'hôte constitue une approche alternative ou complémentaire de choix pour lutter contre l'hépatite C. En effet, bien qu'il faille prendre des précautions quant aux éventuels effets indésirables liés au dysfonctionnement cellulaire, cibler les facteurs de l'hôte permettrait non seulement de multiplier les combinaisons possibles de traitement, mais aussi de les rendre plus efficace contre divers génotypes. Parmi les cibles les plus intéressantes se

trouvent EGFR<sup>17</sup>, EphA2<sup>18</sup> et NPC1L1<sup>19</sup>, trois molécules récemment montrées comme impliquées dans l'entrée virale ; la cyclophyline A, qui joue un rôle dans réplication du virus ; DGAT1<sup>20</sup>, une enzyme impliquée dans l'assemblage des particules virales ; et miR-122, un micro-ARN cellulaire nécessaire à la réplication du VHC (Ploss & Dubuisson, 2012; Salloum & Tai, 2012). Ces acteurs cellulaires de l'infection par le VHC sont particulièrement intéressants car des inhibiteurs connus de leurs fonctions sont déjà sur le marché dans le cadre du traitement d'autres maladies et sont donc correctement tolérées par l'organisme. C'est le cas par exemple du dasatinib, un inhibiteur d'EphA2 ; de l'erlotinib, un inhibiteur d'EGRF et de l'ezetinib, un inhibiteur de NCP1L1. En ce qui concerne l'inhibition de la cyclophyline A, le Debio-025 ou alispovir est en phase III d'étude clinique (**Tableau 1**). Une étude réalisée en 2010 montre qu'un inhibiteur de DGAT1 bloque l'assemblage et donc la sécrétion du virus. Même si ce traitement ne semble pas éliminer le virus, il pourrait être utilisé en complément de molécules à l'action antivirale plus directe. Des inhibiteurs de DGAT1 sont actuellement en étude clinique (phase III) dans le cadre d'un traitement contre l'obésité et le diabète. Enfin, il existe un antagoniste de miR-122, appelé le miravisen (ou SPC-3649) qui est en phase II d'essai clinique. Il s'est montré efficace contre la réplication virale chez des chimpanzés infectés (Lanford *et al.*, 2010).

De petits peptides ciblant les récepteurs cellulaires du VHC sont également en cours d'étude. C'est le cas d'ITX5061, un antagoniste du récepteur membranaire SRB1<sup>21</sup>, qui empêche le transfert des HDL (Syder *et al.*, 2011). D'autres molécules de ce type sont à l'étude, comme par exemple le composé ITX4520, ciblant également SRB1 et récemment sélectionné pour une étude préclinique (Mittapalli *et al.*, 2012).

---

<sup>17</sup> *Epidermal Growth Factor Receptor*

<sup>18</sup> *Ephrin Receptor A2*

<sup>19</sup> *Niemann-Pick C1-like 1*

<sup>20</sup> *Diacylglycerol Acyltransferase-1*

<sup>21</sup> *Scavenger Receptor Class B Type 1*

Investigational HCV Agents (phase IIb-III)					
	NS3 protease inhibitor	Nucleoside/tide NS5B polymerase inhibitor	Non-nucleoside NS5B polymerase inhibitor	NS5A inhibitor	Cyclophilin inhibitor
Vertex			VX-222 (II)		
Merck	MK-5172 (II) Vaniprevir (MK 7009) (III)				
Roche	Danoprevir (RG 7227) (II)	Mericitabine (RG 7128) (II)			
Bristol-Myers-Squibb	Asunaprevir (BMS-650032) (II)	INX-189 (II)		Daclatasvir (BMS-790052) (III)	
Boehringer-Ingelheim	BI-201335 (III)		BI-207127 (II)		
Abbott	ABT 450* (II)		ABT 333 (II) ABT 072 (II)	ABT 267 (II)	
Gilead	GS-9256 (II) GS-9451 (II)	GS-7977 (III) <sup>#</sup>	Tegobuvir (GS-9190) (II)	GS-5885 (II)	
Tibotec	TMC-435 (III)				
Idenix		IDX 184 (II)			
Achillion	ACH-1625 (II)				
Anadys			ANA-598 (II)		
Pfizer			Filibuvir (II)		
Novartis					Alisporivir (Debio 025) (III)

Sources: ClinicalTrials.gov, \*Development in collaboration with Enanta. <sup>#</sup>Formerly PSI-7977 Phase of development in parentheses.

**Tableau 1 : Molécules antivirales en cours d'étude clinique de phases II et III**  
(d'après Wegzyn *et al.*, 2012)

### c) Les perspectives de vaccination

Le développement d'un vaccin apparaît comme l'ultime manière de contrôler l'infection par le VHC à l'échelle mondiale. Outre le fait que le VHC présente sept génotypes différents, la difficulté majeure dans la quête d'un vaccin est la haute fréquence de mutation du génome viral qui aboutit à la production et à la coexistence de nombreuses quasi-espèces virales au sein d'un même individu infecté. De plus, un vaccin contre le VHC doit remplir trois conditions importantes : il doit cibler des épitopes situés dans des régions conservées du génome afin de lutter contre la sélection de mutants d'échappement ; induire une réponse immunitaire robuste et multi-spécifique des cellules T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> ; et enfin permettre l'élimination du virus sans atteintes hépatites. Peu de candidats remplissent ces conditions, mais plusieurs vaccins sont toutefois en test clinique.

Dès 1994, des études ont montré que l'administration de protéines E1 et E2 recombinantes à des chimpanzés induit la production d'anticorps neutralisants et favorise une réponse des cellules T. Ce genre de vaccin prophylactique semble permettre l'élimination du virus avant le passage vers la chronicité (Choo *et al.*, 1994). A ce jour, plusieurs vaccins prometteurs basés sur des protéines recombinantes de ce type

sont à l'étude. D'autres approches vaccinales existent et notamment via l'utilisation de vecteurs viraux, de cocktails de peptides recombinants ou encore de vaccins à base d'ADN (Halliday *et al.*, 2011). D'ailleurs, une avancée importante a été réalisée récemment par des chercheurs français. Les auteurs ont mis au point un système de pseudo-particules chimériques portant à leur surface les glycoprotéines E1 et E2 du VHC. Cette stratégie, déjà décrite dans le cas d'autres virus, semble particulièrement prometteuse puisque qu'elle induit la production d'anticorps neutralisants à large spectre chez la souris et le macaque (Garrone *et al.*, 2011).

La notion de vaccin thérapeutique est également intéressante. Il s'agit non plus de protéger l'hôte d'une potentielle infection, mais de renforcer le système immunitaire des patients contaminés. Cette approche a pour but à la fois d'améliorer la réponse au traitement, mais aussi d'éventuellement diminuer sa durée (Ip *et al.*, 2012). Le IC41 est un exemple de vaccin thérapeutique en test clinique de phase I : il combine cinq peptides recombinants et permet de stimuler la réponse immunitaire des patients (Klade *et al.*, 2008). Egalement, une équipe française a récemment étudié un vaccin thérapeutique nommé TG4040 et consistant en l'expression recombinante de trois protéines du VHC dans un poxvirus atténué (Habersetzer *et al.*, 2011). Ce vaccin a été délivré à une cohorte de patients chroniquement infectés par le VHC et les auteurs ont observé une activation de la réponse T cellulaire corrélée à une diminution de la virémie.

## B. Le virus de l'hépatite C

### 1. Classification et variabilité génomique

Par analyse phylogénétique, le VHC a été classé dans la famille des *Flaviviridae* (Choo *et al.*, 1991). Il appartient au genre des *Hépacivirus* au même titre que le GBV-B, un virus apparenté au VHC par identité de séquence (**Tableau 2**). Même s'il partage des points communs aux membres des deux autres genres de la même famille, à savoir les *Flavivirus* et les *Pestivirus*, il se distingue par exemple par l'organisation génomique de ses protéines (Robertson *et al.*, 1998). Récemment, un nouveau genre a été créé au sein de la famille des *Flaviviridae*, le genre *Pégivirus*, afin d'y classer d'autres GBV (A, C et D) (Stapleton *et al.*, 2011).

Famille	Genre	Exemples de virus
<i>Flaviviridae</i>	<i>Flavivirus</i>	virus de la Dengue virus de la fièvre jaune ou YFV <sup>22</sup>
	<i>Pestivirus</i>	virus de la diarrhée virale bovine virus de la peste porcine classique
	<i>Hépacivirus</i>	<b>VHC</b> , GBV-B
	<i>Pégivirus</i>	GBV-A, GBV-C, GBV-D

**Tableau 2 : Classification du VHC au sein de la famille des *Flaviviridae***

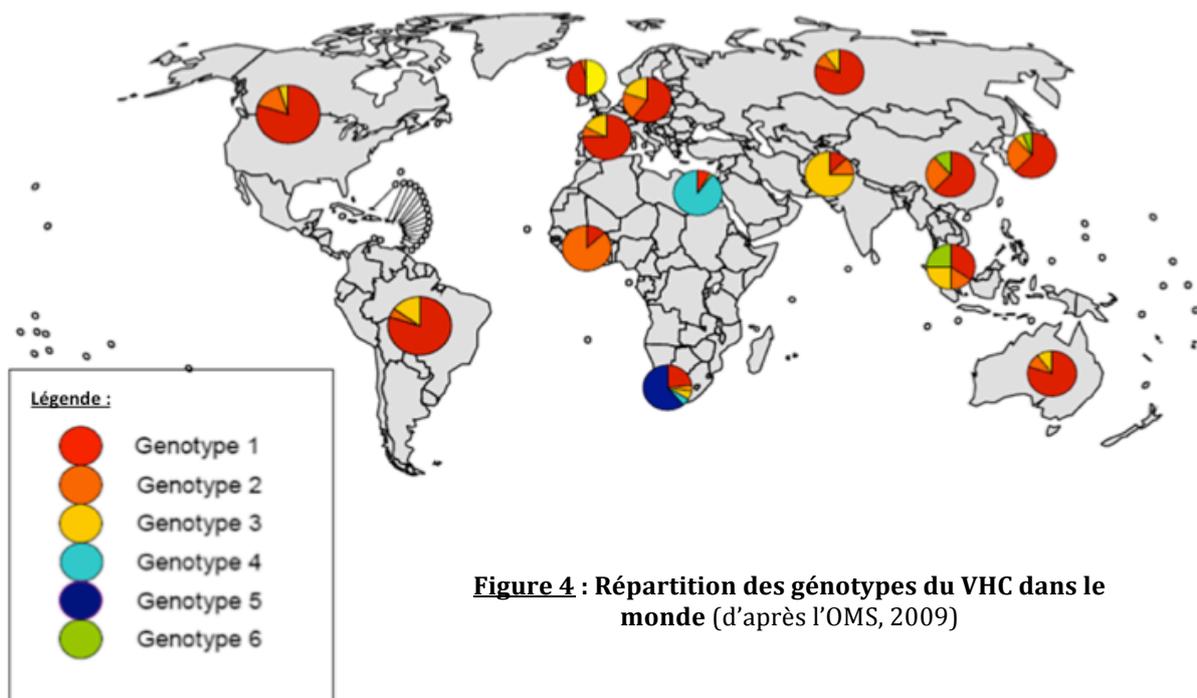
La réplication du VHC met en jeu la protéine NS5B, l'ARN polymérase ARN-dépendante du virus. Cette polymérase est à l'origine d'une grande variabilité de séquence retrouvée au sein des différentes souches du VHC. En effet, elle ne possède pas d'activité de correction et produit un taux d'erreurs de réplication important, estimé entre  $10^{-4}$  et  $10^{-5}$  par position nucléotidique (Pawlotsky, 2003). Associé au taux de production quotidien de nouveaux virions (estimé à  $10^{12}$ ), cela entraîne une accumulation d'erreurs qui conduit à l'existence de génotypes, sous-types et quasi-espèces virales. La variabilité de séquence se trouve donc non seulement entre individus mais également au sein d'une même personne infectée. Ainsi, 6 génotypes majeurs sont

---

<sup>22</sup> *Yellow Fever Virus*

classés et numérotés de 1 à 6. Récemment, l'existence d'un 7<sup>ème</sup> génotype originaire d'Afrique Centrale a été décrit (Murphy *et al.*, 2007). Ces génotypes sont subdivisés en sous-types représentés par des lettres minuscules. Les séquences nucléotidiques des génotypes et les sous-types diffèrent respectivement de 31-33% et 20-25% (Kuiken & Simmonds, 2009). Des homologies de plus de 90% sont attribuées aux quasi-espèces. La présence de quasi-espèces au sein d'un patient participe à l'échappement à la réponse immunitaire (Hahn *et al.*, 2007). Aussi, le génotype influence la réponse au traitement ainsi que la progression de la maladie (Zein, 2000).

La répartition géographique mondiale est différente en fonction des génotypes. Les génotypes 1, 2 et 3 sont présents sur toute la surface du globe alors que d'autres génotypes sont spécifiques de régions plus précises (Zein, 2000). Par exemple, le génotype 4 est majoritairement présent en Egypte et le génotype 5 en Afrique du Sud. En Amérique du Nord et en Europe, les infections par le VHC sont respectivement dues en majorité à des souches de génotypes 1a et 1b (d'après l'Organisation Mondiale de la Santé ou OMS) (**Figure 4**).



**Figure 4 : Répartition des génotypes du VHC dans le monde (d'après l'OMS, 2009)**

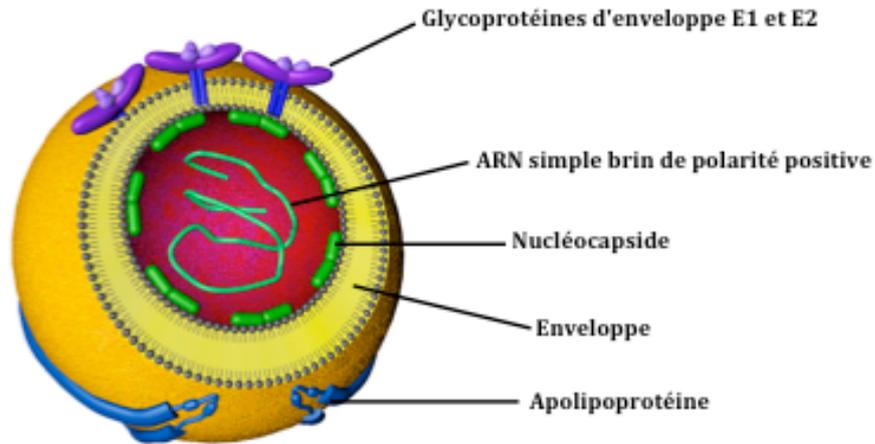
## 2. La particule virale

Les particules virales isolées de sera de patients présentent une composition et une densité hétérogènes (Andre *et al.*, 2002). En effet au cours de son cycle viral, le VHC utilise la voie d'assemblage et de sécrétion des lipoprotéines. Les particules virales acquièrent ainsi des éléments leur conférant une plus faible densité durant la sécrétion (Gastaminza *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2007). Ces particules, à la fois composées d'éléments viraux et lipoprotéiques, sont appelées lipoviroparticules (LVP) (Bartenschlager *et al.*, 2011). Une autre évidence du contenu lipidique des LVP réside dans le fait que les fractions de faible densité peuvent être immunoprécipitées par des anticorps anti-Apolipoprotéines (Apo) B et E, des composants des LDL et des VLDL<sup>23</sup> (lipoprotéines de très faible densité) (Nielsen *et al.*, 2006). Une relation densité-infectiosité des particules virales est établie, puisque que les particules de plus faible densité sont les plus infectieuses (Gastaminza *et al.*, 2006; Vieyres *et al.*, 2010). L'association aux lipoprotéines peut être un bénéfice pour le virus, d'une part pour échapper au système immunitaire et d'autre part dans le processus d'entrée puisque le récepteur aux LDL (LDLR) est décrit comme un facteur d'attachement utilisé par le virus. Une autre étude récente démontre également que la faible densité des particules virales favorise leur fusogénicité (Haid *et al.*, 2009). Les particules virales de plus haute densité sont quant à elles moins infectieuses. Ainsi, une densité intermédiaire est attribuée aux fractions contenant des HDL et les fractions dont la densité est la plus élevée correspondraient à des complexes virus-Ig (Hijikata *et al.*, 1993; Nielsen *et al.*, 2006).

Malgré l'hétérogénéité de sa composition *in vivo*, la structure du VHC est établie (**Figure 5**). Il s'agit d'un virus enveloppé, de forme sphérique et d'un diamètre d'environ 60 nm comme l'ont notamment révélées des études de microscopie électronique (Gastaminza *et al.*, 2010; Kaito *et al.*, 1994). L'enveloppe est une bicouche lipidique issue de la cellule hôte et dans laquelle sont ancrées les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2. A l'intérieur de cette enveloppe se trouve la nucléocapside, composée de la protéine de capsid et qui renferme un simple brin d'ARN de polarité positive constituant le génome viral.

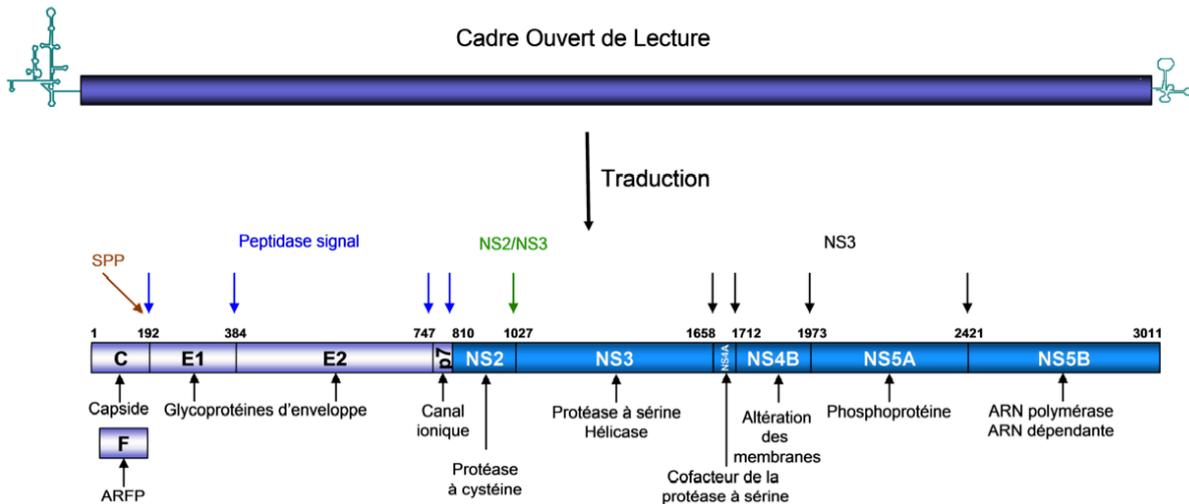
---

<sup>23</sup> *Very Low Density Lipoprotein*



**Figure 5 : Représentation schématique de la lipovirionne du VHC**  
(D'après Bartenschlager et al., 2011)

### 3. L'organisation génomique



**Figure 6 : Organisation génomique du VHC**

L'ARN génomique est constitué d'un cadre de lecture ouvert (en violet foncé) encadré de deux régions non codantes (en turquoise). Ce cadre est traduit en une polyprotéine unique qui est clivée par la peptidase de signal peptide (SPP) (flèche marron), des signal-peptidases cellulaires (flèches bleues) et virales (NS2/3 (flèche verte) et le complexe NS3/4A (flèches noires)). Les protéines structurales sont représentées en violet clair et les protéines non-structurales en bleu. Les sites de clivage indiqués correspondent à ceux de la souche H (génotype 1a ; numéro d'accèsion AF009606).

Le génome du VHC est constitué par un ARN simple brin de polarité positive d'environ 9,6 kb. Deux extrémités non codantes, une en 5' (5'-NC) et une en 3' (3'-NC),

flanquent un unique cadre ouvert de lecture ou ORF<sup>24</sup> qui code une seule polyprotéine. Les protéines structurales (la protéine de capsid C et les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2) occupent la partie N-terminale de la polyprotéine tandis que les protéines non structurales (les protéines p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B) sont situées au centre et à l'extrémité C-terminale. Enfin, une onzième protéine, appelée protéine F ou ARFP<sup>25</sup>, pourrait être produite suite à un décalage du cadre de lecture au niveau de la séquence de la protéine de capsid (**Figure 6**).

### a) Les extrémités non-codantes

❖ La région 5'NC joue un rôle important dans la réplication et l'initiation de la traduction des ARN. Il s'agit d'une région très conservée, composée des 341 premiers nucléotides du génome viral. La région 5'NC est hautement structurée et consiste en quatre grands domaines (I à IV). Les domaines I et II, constitués des nucléotides 1 à 115, contiennent des signaux particulièrement importants pour la réplication du virus, mais la séquence complète est nécessaire à ce processus (Friebe *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2002). Les nucléotides 44 à 341, constituant les domaines II, III et IV de la région 5'NC, ainsi que le début de la séquence de la protéine de capsid contiennent un site interne d'entrée des ribosomes (IRES). Cette région est essentielle à l'initiation de la traduction de l'ARN via le recrutement de la sous-unité ribosomale 40S (Pestova *et al.*, 1998). La région 5'NC est également la cible de miR-122, un micro-ARN qui favorise la traduction (Niepmann, 2009).

Son haut taux de conservation et son importance au cours des processus de réplication et de traduction font de la région 5'NC une bonne cible thérapeutique. D'ailleurs, des ARN interférents dirigés contre cette région du génome inhibent la traduction (Chevaliez & Pawlotsky, 2007; Kanda *et al.*, 2007). De plus, cette région 5'NC est largement utilisée afin de génotyper les souches virales.

❖ Une seconde région NC constitue les 200 à 235 derniers nucléotides de la séquence génomique : la région 3'NC. Cette région est globalement très variable en fonction du génotype et se divise en trois domaines distincts : un premier domaine peu

---

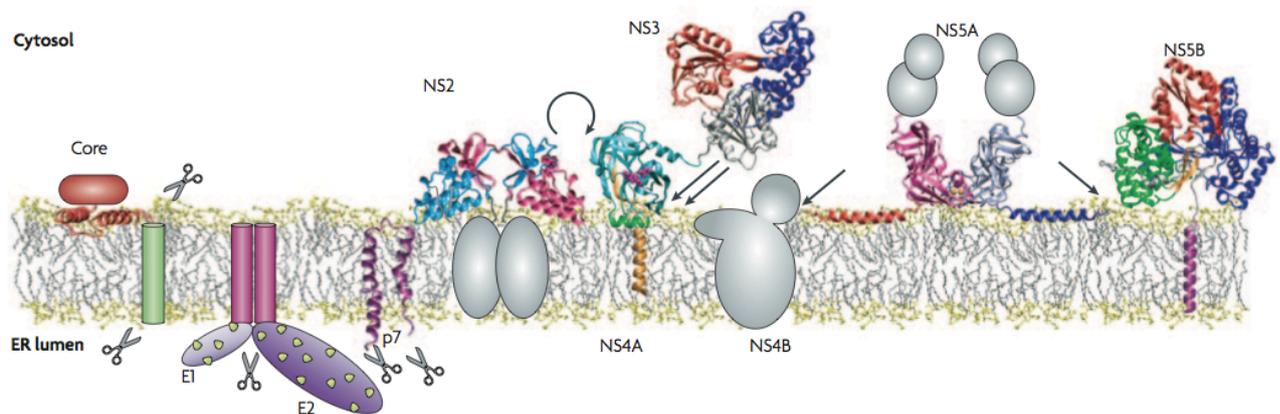
<sup>24</sup> *Open Reading Frame*

<sup>25</sup> *Alternative Ribosomal Frameshift Protein*

conservé de 40 nucléotides environ, un deuxième domaine comportant un motif polyuracile/pyrimidine de longueur variable et enfin, un troisième domaine très conservé de 98 nucléotides aussi appelé X-tail (Kolykhalov *et al.*, 2000). Cette région X-tail se compose de trois tiges-boucles (Tanaka *et al.*, 1996). Les éléments conservés de cette région sont essentiels à la réplication du virus (Kolykhalov *et al.*, 2000; Yi & Lemon, 2003). Le domaine variable, celui comportant le motif polyU/C ainsi que la troisième tige-boucle de la région X-tail sont impliqués sans la traduction du génome via la stimulation de l'activité de l'IRES (Song *et al.*, 2006). Aussi, la deuxième tige-boucle de la région 3'NC interagit avec une boucle de la protéine NS5B. Cette interaction est nécessaire au processus de réplication (Friebe *et al.*, 2005).

## b) Les protéines virales

La polyprotéine du VHC est clivée de manière co et post-traductionnelle pour générer les 3 protéines structurales (C, E1 et E2) et les 7 protéines non-structurales (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B). Les clivages entre C et E1 ; E1 et E2 ; E2 et p7 ; et p7 et NS2 sont effectués par des peptidases signal cellulaires, tandis que le reste des clivages est assuré par les protéases virales NS2 et NS3/4A (Dubuisson *et al.*, 2002; Moradpour *et al.*, 2007) (**Figures 6 et 7**).



**Figure 7 : Les protéines du VHC et leur association avec la membrane du réticulum endoplasmique** (D'après Moradpour *et al.*, 2007)

Les ciseaux (✂) indiquent les clivages par les peptidase de peptide signal (coté cytosolique) et signal peptidase du réticulum endoplasmique (coté luminal). La flèche cyclique (↻) montre l'autoclivage par la protéase NS2/3. Les flèches droites (↘) indiquent les clivages par le complexe NS3/NS4A. Les structures connues des différentes protéines sont représentées à la même échelle que la bicouche lipidique. Les structures non déterminées sont représentées par des sphères et des cylindres colorés avec leurs tailles approximatives.

### ❖ *La protéine de capsid*

La protéine de capsid, ou protéine C, est la protéine constitutive de la nucléocapsid du virus. Sa séquence, riche en acides aminés proline et basiques (arginine et lysine), est relativement conservée entre les différents génotypes. La production de cette protéine se fait en deux étapes : un premier clivage produit la protéine de capsid immature de 191 résidus et 23kDa, puis un deuxième clivage permet la maturation de la protéine, pour une protéine C mature d'environ 177 résidus et 21kDa (Okamoto *et al.*, 2008). Le premier clivage est effectué par une signal peptidase et le deuxième est réalisé par une peptidase de peptide signal (McLauchlan, 2000). Une vingtaine de résidus situés à l'extrémité C-terminale de la protéine immature sert de peptide signal pour la protéine E1 et est impliquée dans la translocation de E1 dans la lumière du réticulum endoplasmique (RE) (Okamoto *et al.*, 2008; Santolini *et al.*, 1994).

La protéine mature est composée de deux domaines D1 et D2. D1, situé en N-terminal de la protéine, couvre les résidus 1 à 118. Il est hydrophile et contient des acides aminés basiques qui permettent l'assemblage de la nucléocapsid. Ce domaine est également impliqué dans l'interaction entre la protéine C et l'extrémité 5' de l'ARN génomique (Klein *et al.*, 2005). Enfin, il favorise la formation de microtubules *in vitro* en interagissant avec la tubuline (Roohvand *et al.*, 2009). Au contraire, D2 est un domaine hydrophobe situé dans la partie C-terminale de la protéine C mature. Il est composé de deux hélices  $\alpha$  séparées par une petite boucle hydrophile. Ce domaine assure la maturation et la mise en conformation de D1 et confère à la protéine mature ses propriétés membranaires (Boulant *et al.*, 2006). La protéine de capsid est notamment retrouvée au niveau de membranes associées aux gouttelettes lipidiques (GLs) (Moradpour *et al.*, 1996; Rouillé *et al.*, 2006).

Une étude récente montre que des acides aminés basiques de la partie N-terminale de la protéine de capsid sont essentiels à la production de particules infectieuses (Alsaleh *et al.*, 2010). De plus, la protéine C a été montrée comme pouvant réguler l'expression de gènes cellulaires jouant un rôle dans divers processus tels que la réponse immunitaire ou l'apoptose (Nguyen *et al.*, 2006). Aussi, de part sa localisation au niveau des GLs, cette protéine pourrait altérer le métabolisme des lipides. D'ailleurs, des études *in vitro* ou en souris transgéniques ont montré que cette protéine a des pouvoirs d'induction de stéatose hépatique et de carcinome hépatocellulaire (Jackel-

Cram *et al.*, 2007; Moriya *et al.*, 1997; 1998). Son effet carcinogène pourrait être lié à ses activités pro- et anti-apoptotiques (Stephen L Chen, 2006). Clairement donc, le rôle de la protéine C ne se limite pas à celui de brique pour l'assemblage de la nucléocapside virale.

### ❖ *La protéine F*

Une onzième protéine virale peut être produite suite à la traduction d'un cadre de lecture alternatif dans la séquence de la protéine de capsid. L'existence de sites alternatifs d'initiation de la traduction a également été proposée afin d'expliquer son existence (Branch *et al.*, 2005). Cette protéine de 17kDa environ est appelée protéine F ou ARFP. En fonction du génotype, la taille de sa séquence varie mais ne dépasse pas les 160 acides aminés (Boulant *et al.*, 2003). Il semble que cette protéine soit naturellement exprimée lors d'une infection par le VHC. En effet, des anticorps dirigés contre la protéine F ont été trouvés chez des patients chroniquement infectés (Xu *et al.*, 2001). Concernant son rôle, elle ne semble pas essentielle au processus de réplication du virus (McMullan *et al.*, 2007; Vassilaki *et al.*, 2008). Par contre, elle pourrait réguler la dégradation protéique, puisqu'elle interagit avec la sous-unité  $\alpha$  du protéasome (Yukseket *et al.*, 2009), ou avoir un rôle immunomodulateur. Ainsi, des études récentes lui attribuent un rôle dans la progression vers l'hépatocarcinome (Dalagiorgou *et al.*, 2011; Fiorucci *et al.*, 2007).

### ❖ *Les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2*

Cette partie sera abordée dans la **partie I.C.1**

### ❖ *p7*

La protéine p7 est une petite protéine hydrophobe de 63 acides aminés. Au niveau de la polyprotéine précurseur, elle se situe entre les protéines structurales et les protéines non-structurales et plus précisément entre E2 et NS2. Les clivages N et C-terminaux sont effectués par une peptidase signal d'origine cellulaire. Ces clivages ne sont pas toujours efficaces et donnent naissance à des formes E2/p7 et p7/NS2 (Stephen L Chen, 2006) qui ne semblent pas jouer de rôle lors de l'infection ((Jones *et al.*, 2007)). Cette protéine est composée de deux segments transmembranaires (TM) liés par une

petite boucle cytoplasmique basique. Dans la cellule, p7 est localisée au niveau du RE et des mitochondries (Carrère-Kremer *et al.*, 2002; Griffin *et al.*, 2005). Sa fonction est encore mal connue mais elle est essentielle à une infection productive en culture cellulaire et chez le chimpanzé (Jones *et al.*, 2007; Sakai *et al.*, 2003). Elle n'est pas impliquée dans la réplication du virus mais il semble qu'elle joue un rôle dans la morphogénèse et la sécrétion des particules virales infectieuses (Jones *et al.*, 2007; Steinmann *et al.*, 2007). *In vitro*, des études montrent que p7 s'associe en multimères de manière à former des canaux ioniques (Griffin *et al.*, 2004; Pavlovic *et al.*, 2003). L'organisation de p7 ainsi que son activité de canal ionique ont été vérifiées par RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) et microscopie électronique (Luik *et al.*, 2009; Montserret *et al.*, 2010). Son rôle dans le cycle viral et son organisation en canal ionique en font une cible thérapeutique intéressante. Des stratégies visant à empêcher l'oligomérisation de p7 ou à bloquer l'activité du canal ionique sont par exemple évoquées (Steinmann & Pietschmann, 2010).

## ❖ NS2

NS2 est une protéine de 23kDa codée par les résidus 810 à 1026 de la polyprotéine du VHC. Il s'agit d'une protéine membranaire dont la topologie est controversée. Les études structurales les plus récentes montrent que NS2 possède probablement trois TM et un domaine protéase cytosolique (Jirasko *et al.*, 2008; Lorenz *et al.*, 2006).

Le clivage entre p7 et NS2 est réalisé par une peptidase signal cellulaire (Carrère-Kremer *et al.*, 2002; 2004), alors que le clivage entre NS2 et NS3 s'effectue de manière autoprotéasique (Grakoui *et al.*, 1993). En effet, NS2 possède une activité protéase intrinsèque qui permet le clivage entre NS2 et NS3 et ce en association avec le tiers N-terminal de la protéine NS3 qui agit comme co-facteur (Lindenbach & Rice, 2005). La structure du domaine protéasique de NS2 indique qu'il s'agit d'une protéase à cystéine dimérique avec deux sites actifs (Lorenz *et al.*, 2006). La protéine chaperone Hsp<sup>26</sup>90 est nécessaire à son activation (Waxman *et al.*, 2001). Le clivage NS2-NS3 est important pour la réplication de l'ARN viral en culture cellulaire (Jones *et al.*, 2007; Welbourn *et al.*, 2005) ainsi qu'à l'infection *in vivo* (Kolykhalov *et al.*, 2000).

---

<sup>26</sup> Heat Shock Protein

En plus de son rôle protéolytique, NS2 joue un rôle dans l'assemblage de la particule virale. Notamment, il a été montré qu'une mutation ponctuelle au sein de NS2 bloque l'assemblage à un stade tardif (Yi *et al.*, 2009). Aussi, des études récentes mettent en évidence le rôle de NS2 en tant que médiateur des différentes protéines virales au cours du processus d'assemblage (Jirasko *et al.*, 2010; Ma *et al.*, 2011; Popescu *et al.*, 2011).

Enfin, NS2 est un site préférentiel de jonction au sein de chimères génotypiques artificielles (Pietschmann *et al.*, 2006; Yi *et al.*, 2007) ou naturelles (Kalinina *et al.*, 2002; Noppornpanth *et al.*, 2006).

### ❖ NS3/4A

NS3 et NS4A sont des protéines de respectivement 70 et 8 kDa codées par les résidus 1027 à 1657 et 1658 à 1711 de la polyprotéine virale.

NS3 possède deux fonctions enzymatiques : une activité de protéase à sérine est détenue par le tiers N-terminal de la protéine tandis que les deux tiers C-terminaux possèdent une activité hélicase/NTPase<sup>27</sup>.

La petite protéine virale NS4A sert de co-facteur à l'activité du domaine sérine protéase de NS3 (Failla *et al.*, 1994). Ainsi, NS3/4A assure les clivages entre NS3 et NS4A, NS4A et NS4B, NS4B et NS5A, NS5A et NS5B (Bartenschlager *et al.*, 1995). Lorsqu'elle est exprimée seule, NS3 est localisée de manière diffuse dans la cellule. Par contre, en association avec NS4A, NS3 est adressée au niveau de la membrane du RE (Wölk *et al.*, 2000). En effet, l'extrémité N-terminale hydrophobe de NS4A est responsable de cette localisation de NS3. Comme évoqué précédemment, l'extrémité N-terminale de NS3 sert aussi de co-facteur à NS2. En plus des clivages au sein de la polyprotéine du VHC, NS3/4A est également capable de cliver des protéines cellulaires, notamment TRIF<sup>28</sup> et MAVS<sup>29</sup>, deux protéines impliquées dans la reconnaissance des ARN doubles brins. De cette façon, NS3/4A interfère avec les voies de signalisation RIG-I et TLR-3 et bloque ainsi la réponse antivirale innée de l'hôte (Cheng *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2005b; Meylan *et al.*, 2005).

---

<sup>27</sup> Nucleotide Triphosphatase

<sup>28</sup> TLR domain containing adaptor inducing IFN- $\beta$

<sup>29</sup> Mitochondrial Antiviral Signaling

L'activité NTPase de NS3 permet de fournir de l'énergie à l'activité hélicase de cette même protéine, via l'hydrolyse de l'ATP<sup>30</sup>. Ce domaine hélicase/NTPase est important à la fois pour la réplication *in vitro* et l'infection *in vivo* (Kolykhalov *et al.*, 2000; Lam & Frick, 2006). Cependant, sa fonction précise n'est pas clairement définie. Elle serait impliquée dans le déroulement des structures secondaires des brins d'ARN ou encore la dissociation des complexes ARN-ARN. D'ailleurs, même si la protéine NS3 sous forme monomérique est capable de lier l'ARN, sa forme dimérique est nécessaire afin de dérouler des duplexes d'ARN et ainsi de faciliter la réplication (Serebrov & Pyle, 2004). Récemment, une étude structurale a montré que la conformation de NS3 varie après la fixation et l'hydrolyse de l'ATP, menant à un modèle dynamique de translocation unidirectionnelle (Gu *et al.*, 2010). Plusieurs facteurs interviennent afin d'améliorer l'efficacité de ce processus : le domaine protéase de NS3 (Beran *et al.*, 2007), les ions Mn<sup>2+</sup> (Belon & Frick, 2009) et également NS4A (Pang *et al.*, 2002). Enfin, NS3 pourrait jouer un rôle lors de l'assemblage des particules virales. En effet, certaines mutations de résidus conservés peuvent bloquer la production virale sans altérer l'étape de réplication (Ma *et al.*, 2008). Aussi, une étude récente montre que le complexe NS3/4A pourrait réguler l'équilibre entre réplication et production de particules virales (Chatel-Chaix *et al.*, 2011).

Concernant NS4A, en plus de son rôle de co-facteur à l'activité protéasique et hélicase de NS3, un rôle au niveau du processus de réplication lui a été attribué, via une régulation positive de l'hyperphosphorylation de NS5A (Koch & Bartenschlager, 1999; Lindenbach *et al.*, 2007).

De manière intéressante le téléprévir et le bocéprévir, deux agents thérapeutiques récemment approuvés dans le traitement de l'hépatite C par trithérapie, sont des inhibiteurs de l'activité protéasique du couple NS3/4A (Salloum & Tai, 2012).

#### ❖ NS4B

NS4B, protéine virale de 27 kDa, correspond aux résidus 1712 à 1972 de la polyprotéine et est clivée par la protéase NS3/4A. C'est une protéine hydrophobe ancrée dans la membrane du RE et possédant quatre TM. Ses extrémités N et C-terminales sont chacune composées de deux hélices  $\alpha$  orientées vers le cytoplasme et jouent un rôle

---

<sup>30</sup> Adenosine-5'-Triphosphate

dans la localisation de la protéine au niveau des membranes du RE (Elazar *et al.*, 2004; Gouttenoire *et al.*, 2009a, b). Cependant, l'extrémité N-terminale peut être transloquée dans la lumière du RE, induisant la formation d'un cinquième TM (Lundin *et al.*, 2003). L'expression de NS4B suffit à altérer les membranes du RE et à induire la formation du « *membranous web* », un réseau de membranes associé au complexe de réplication du VHC (Egger *et al.*, 2002). Il semble que cela passe par des interactions entre NS4B et des protéines virales et cellulaires, de manière dépendante de sa palmitoylation (Yu *et al.*, 2006). En effet, il a été montré récemment que l'oligomérisation de NS4B est importante pour la formation du « *membranous web* » et donc pour la réplication (Gouttenoire *et al.*, 2010). Cette implication de NS4B dans le processus de réplication virale est également décrite dans d'autres études. Des mutants de l'extrémité C-terminale de NS4B sont défectifs dans l'hyperphosphorylation de NS5A ce qui entraîne une altération de la réplication du virus (Jones *et al.*, 2009). De plus, il a été montré que NS4B présente une activité NTPasique au niveau de l'extrémité N-terminale et que l'hydrolyse de l'ATP ou du GTP via cette activité enzymatique est nécessaire à la réplication du VHC (Einav *et al.*, 2004; Thompson *et al.*, 2009). Outre son rôle au niveau de la réplication, NS4B pourrait aussi jouer un rôle dans l'assemblage et la sécrétion des particules virales puisque certains mutants de cette protéine favorisent la production de virus sans influencer l'étape de réplication (Jones *et al.*, 2009). NS4B interfère également avec la voie de signalisation RIG-I (Tasaka *et al.*, 2007) et ce probablement en interagissant directement avec STING<sup>31</sup>, un activateur de la voie de signalisation médiée par RIG-I (Nitta *et al.*, 2012). Enfin, un rôle de NS4B dans la progression de l'atteinte hépatique est aussi rapporté. En effet, NS4B est capable d'induire la transformation des cellules à la fois *in vitro* et *in vivo* (Einav *et al.*, 2008). Aussi, NS4B induit l'activité des SREBPs<sup>32</sup>, facteurs de transcription qui activent l'expression d'enzymes du métabolisme lipidique et favorisent l'accumulation de lipides au sein des cellules (Park *et al.*, 2009).

Aux vues de l'importance du rôle de NS4B au cours du cycle viral et notamment pour le bon déroulement de l'étape de réplication, l'intérêt de cette protéine en tant que cible thérapeutique est de plus en plus considéré (Rai & Deval, 2011).

---

<sup>31</sup> *Stimulator of Interferon Genes*

<sup>32</sup> *Sterol Regulatory Element-Binding Proteins*

## ❖ NS5A

NS5A (résidus 1973 à 2420) est une phosphoprotéine associée à la membrane du RE. Deux formes co-existent : une NS5A phosphorylée de 56 kDa et une forme hyperphosphorylée de 58 kDa (Grakoui *et al.*, 1993). NS5A est capable de lier l'ARN viral (Huang *et al.*, 2005a). Les 30 premiers acides aminés de sa partie N-terminale forment une hélice  $\alpha$  amphipatique très conservée et nécessaire à la localisation de NS5A ainsi qu'à la réplication virale (Brass *et al.*, 2002; Elazar *et al.*, 2003; Penin *et al.*, 2004). Cette protéine est localisée au niveau du complexe de réplication associé au « *membranous web* » mais également à proximité des GLs, en association avec la protéine de capsid (Miyinari *et al.*, 2007). NS5A possède également un motif de localisation nucléaire en C-terminal. Certaines protéines tronquées au niveau de la région d'ancrage membranaire peuvent d'ailleurs être retrouvées dans le noyau, suggérant un rôle de cette protéine virale dans la régulation de gènes cellulaires (Sato *et al.*, 2000). Entre les deux extrémités, NS5A est organisée en trois domaines, nommés D1 à D3. Brièvement, D1 contient un motif fixant un ion zinc essentiel au rôle de NS5A dans la réplication virale (Tellinghuisen *et al.*, 2004; Tellinghuisen *et al.*, 2005). Ce domaine favorise également l'association de NS5A avec les GLs (Miyinari *et al.*, 2007). Les fonctions de D2 et D3 sont moins décrites. D2 possède des résidus essentiels à la réplication (Tellinghuisen *et al.*, 2008a) et D3 joue un rôle dans le processus d'assemblage du virus (Appel *et al.*, 2008) notamment en interagissant avec la protéine de capsid (Masaki *et al.*, 2008). Aussi, des études rapportent une interaction directe entre les D2 et D3 de NS5A et les cyclophilines, protéines cellulaires impliquées dans la réplication du VHC (Hanouille *et al.*, 2009 ; Verdegem *et al.*, 2011).

La phosphorylation de NS5A est assurée par la caséine-kinase II (Kim *et al.*, 1999) et, comme déjà évoqué précédemment, d'autres protéines virales et notamment NS3, NS4A et NS4B sont impliquées dans la régulation de l'hyperphosphorylation de NS5A (Koch & Bartenschlager, 1999). Cette hyperphosphorylation régule négativement la réplication, via une interaction avec hVAP-A<sup>33</sup>, une protéine nécessaire à la réplication du VHC (Evans, 2004). De plus, la phosphorylation au niveau de certains résidus de la partie C-terminale de NS5A semble jouer un rôle dans la production de particules virales infectieuses (Appel *et al.*, 2005; Masaki *et al.*, 2008; Tellinghuisen *et al.*, 2008b). NS5A

---

<sup>33</sup> *human Vesicle-Associated membrane Protein-associated protein A*

serait donc une protéine déterminante pour la régulation de l'équilibre entre la réplication de l'ARN du VHC et l'assemblage des particules virales.

NS5A interagit également avec des protéines cellulaires, régulant ainsi des voies de signalisation et participant au mécanisme d'évasion au système immunitaire (Macdonald & Harris, 2004). Par exemple, NS5A peut interférer avec la réponse innée de l'hôte liée à l'IFN en induisant la déphosphorylation de STAT-1<sup>34</sup> (Lan *et al.*, 2007) ou en favorisant la production d'IL-8, une cytokine qui interfère avec les propriétés antivirales de l'IFN (Polyak *et al.*, 2001).

NS5A est donc une protéine clé du cycle viral du VHC et divers inhibiteurs de ses fonctions sont en cours d'étude clinique (**Partie I.A.7.b**).

### ❖ NS5B

NS5B est une protéine virale de 68 kDa. Elle est codée par les acides aminés 2421 à 3011 de la polyprotéine et constitue l'ARN polymérase ARN-dépendante du VHC. Elle possède un motif Gly-Asp-Asp caractéristique des polymérases de cette famille (Behrens *et al.*, 1996; Grakoui *et al.*, 1993). Les 531 premiers résidus N-terminaux constituent la partie enzymatique de la protéine (Bressanelli *et al.*, 1999). NS5B est ancrée dans la membrane du RE par un TM en forme d'hélice  $\alpha$  et composé des 21 derniers résidus C-terminaux (Schmidt-Mende *et al.*, 2001). Cette insertion membranaire est essentielle à la réplication du VHC (Moradpour *et al.*, 2004a).

La structure tridimensionnelle de NS5B révèle une organisation en forme de « main droite », constituée de trois domaines appelés « doigts », « pouce » et « paume » (Bressanelli *et al.*, 1999). En interagissant avec la région du « pouce », le domaine « doigts » forme un tunnel permettant d'acheminer l'ARN jusqu'à la « paume », qui correspond au site actif de la polymérase. De manière intéressante, la haute efficacité de la souche virale JFH-1<sup>35</sup> a été corrélée à une configuration plus fermée de cette « main droite », en raison de changements dans la séquence en acides aminés de NS5B. Aussi, introduites dans d'autres souches virales, ces différences de séquence permettent d'améliorer considérablement l'activité polymérase (Schmitt *et al.*, 2011; Simister *et al.*,

---

<sup>34</sup> *Signal Transducer and Activator of Transcription 1*

<sup>35</sup> *Japanese Fulminant Hepatitis- isolate 1*

2009). Au cours de son activité polymérase, NS5B fait de nombreuses erreurs qui contribuent à la grande variabilité du génome du VHC.

L'activité polymérase de NS5B nécessite des interactions avec des protéines virales et cellulaires. Par exemple, il a été montré que NS5A interagit avec NS5B et régule son activité polymérase (Shirota *et al.*, 2002). En ce qui concerne les protéines cellulaires, les cyclophilines interviennent aussi dans la réplication du VHC via leur interaction avec NS5B. En effet, elles favorisent l'interaction entre NS5B et l'ARN (Kaul *et al.*, 2009; Watashi *et al.*, 2005). D'ailleurs, des inhibiteurs de cyclophilines bloquent la réplication et le Debio-025, un inhibiteur de la cyclophiline A, est en phase 3 d'étude clinique dans le traitement contre le VHC (**Partie I.A.7.b**). Egalement, la protéine kinase PRK2<sup>36</sup> phosphoryle NS5B et cette phosphorylation est nécessaire au processus de réplication (Kim *et al.*, 2004).

#### 4. Les modèles d'étude

Depuis le clonage du génome VHC en 1989, il a fallu attendre 16 ans avant qu'un système permette la réplication et l'amplification de virus en culture cellulaire. En effet, ce n'est qu'en 2005 qu'une souche virale permettant un tel progrès a été découverte chez un patient atteint d'une hépatite fulminante et que le système de culture cellulaire du VHC (VHCcc) a pu être mis en place. Avant cela pourtant, les connaissances à propos du VHC et notamment concernant l'organisation génomique, la maturation de la polyprotéine, les propriétés des protéines virales ou encore les étapes de son cycle ont pu progresser grâce à différents modèles d'étude *in vitro* et *in vivo*. Ainsi, les analyses à partir de sera de patients infectés et les infections expérimentales de chimpanzés ont été bénéfiques afin de mieux comprendre les propriétés physiques et la pathogenèse du VHC. Aussi, les réplicons et les particules rétrovirales pseudotypées avec les glycoprotéines d'enveloppe du VHC (VHCpp) ont par exemple permis d'étudier respectivement les étapes de réplication et d'entrée du VHC.

---

<sup>36</sup> *Protein kinase C-Related Kinase 2*

## a) Les modèles cellulaires

### ❖ *Infection par le VHC isolé chez des patients*

Dans le but d'établir un système cellulaire de culture du VHC, les premières tentatives ont été menées à partir de cellules hépatiques provenant de patients chroniquement infectés par le VHC. Ainsi, Ito et son équipe ont montré que le VHC est répliqué et que des particules virales infectieuses sont produites au sein d'hépatocytes primaires issus de patients infectés (Ito *et al.*, 1996). Une autre approche a été d'infecter des hépatocytes primaires, issus de patients ou de chimpanzés, avec du virus isolé à partir de sera de patients infectés par le VHC. Ces systèmes ont montré que les hépatocytes primaires sont infectables dans ces conditions (Fournier *et al.*, 1998; Lanford *et al.*, 1994; Molina *et al.*, 2007; 2008; Rumin *et al.*, 1999). En 2008, il a également été montré qu'il est possible d'infecter et de produire des particules virales infectieuses à partir d'hépatocytes primaires, infectés par des particules virales de différents géotypes issues de patients (Buck, 2008). Les modèles utilisant des hépatocytes primaires ont l'avantage de refléter au mieux le comportement naturel du VHC *in vivo*. Cependant, ils présentent de nombreux inconvénients, tels que la difficulté et le coût élevé de leur entretien ou encore les faibles taux de réplication et de production virale. De plus, la grande variabilité dans la qualité des cellules en fonction des patients dont sont issues les cellules mène à des problèmes de reproductibilité des expériences. Enfin, l'obtention de virus isolé de sera de patients est relativement contraignante puisque dépendante des disponibilités cliniques.

### ❖ *Systèmes d'expression hétérologue des glycoprotéines d'enveloppe*

Ce système consiste en la transfection de plasmides, l'infection ou la transduction de virus recombinants comme vecteurs de l'expression des protéines virales. Par exemple, les propriétés du virus Vaccine ou du virus Sindbis (SinV) ont été exploitées afin de permettre l'expression des glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 en cellules hépatocytaires. Ainsi, cette approche a apporté un certain nombre d'informations sur la localisation, les propriétés et la structure de E1 et E2 (Dubuisson *et al.*, 1994; 2000; Patel *et al.*, 2000). Elle a néanmoins le désavantage majeur de ne pas refléter la

complexité des processus et ne permet d'étudier que de manière très limitée le cycle viral.

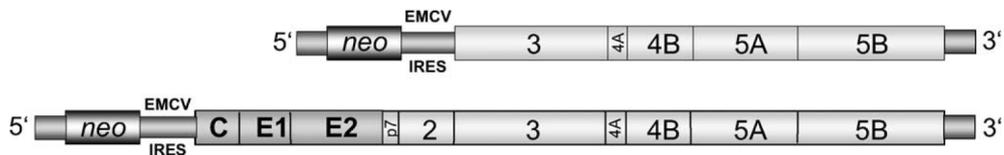
Toutefois, ce système a notamment permis aux équipes de Pileri et Scarselli, en 1998 et 2002, d'étudier respectivement les interactions VHC-CD81 et VHC-SRB1. En effet, c'est l'expression d'une forme soluble de E2 (sE2) tronquée au niveau du TM qui a permis aux auteurs de proposer ces deux protéines cellulaires comme récepteurs du virus (Pileri *et al.*, 1998; Scarselli *et al.*, 2002). Donc, même si les sE2 ne reflètent pas totalement les protéines E2 présentes à la surface des particules virales et notamment en terme de conformation, elles se sont montrées très utiles pour l'analyse de telles interactions (Brazzoli *et al.*, 2005; Cocquerel *et al.*, 2003b; Flint *et al.*, 2006; Owsianka *et al.*, 2001).

### ❖ *Réplicons génomiques et sous-génomiques*

Les réplicons sont des unités autonomes de réplication. On distingue les réplicons génomiques et sous-génomiques suivant qu'ils contiennent respectivement tout le génome ou uniquement les protéines non-structurales du VHC, en partie ou en totalité. Typiquement, les réplicons de VHC sont des ARN bicistroniques flanqués par les extrémités 5' et 3' NC du génome. Ils sont tout d'abord composés des protéines virales sous la dépendance de l'IRES du virus de l'encéphalomyocardite (EMCV) mais également d'un gène de résistance à un antibiotique, généralement la néomycine, sous la dépendance de l'IRES du VHC (**Figure 8**). Ces constructions sont ensuite transfectées dans des cellules humaines d'origine hépatocytaire (les cellules Huh-7) et des clones cellulaires présentant de haut taux répliatifs peuvent être isolés grâce à la sélection par la néomycine. D'ailleurs, une fois curées par un traitement IFN, certaines de ces cellules sont devenues des outils précieux pour l'étude du VHC. En effet, les cellules Huh-7.5 et Huh-7.5.1 (Lindenbach *et al.*, 2005; Zhong *et al.*, 2005), couramment utilisées pour produire de meilleurs titres infectieux dans le contexte des VHCcc, sont issues d'un tel traitement sur les cellules Huh-7 et Huh-7.5, respectivement.

Grâce à ces réplicons du VHC, le complexe de réplication a pu être observé (Moradpour *et al.*, 2004b) et l'utilisation de réplicons sous-génomiques portant les protéines NS3 à NS5B a montré que la protéine NS2 n'est pas nécessaire à la réplication (Lohmann *et al.*, 1999). Aussi, après plusieurs passages des cellules en culture cellulaire,

des mutations d'adaptation ont été identifiées, notamment dans la séquence de NS3, NS4B et NS5A (Bartenschlager *et al.*, 2003). Certaines de ces mutations augmentent considérablement l'efficacité de répllication (Blight *et al.*, 2000; Krieger *et al.*, 2001).



**Figure 8 : Représentation schématique de réplicons du VHC**

Les réplicons sont constitués d'une séquence d'ARN codant un marqueur de sélection (ici le gène de résistance à la néomycine) sous la dépendance de l'IRES du VHC, puis d'une séquence codant les protéines virales, sous la dépendance de l'IRES de l'EMCV. Le tout est encadré par les régions 5' et 3' NC du VHC.

Le réplicon sous-génomique (**en haut**) ne porte que la séquence codant les protéines NS3 à NS5B, alors que le réplicon génomique (**en bas**) porte la séquence codant l'ensemble des protéines du VHC.

Hormis dans le contexte de la souche virale JFH-1, les tentatives de production de particules virales à partir de réplicons génomiques se sont avérées infructueuses (Pietschmann *et al.*, 2002). L'une des explications viendrait des mutations d'adaptation sélectionnées qui pourraient modifier les interactions avec des protéines virales et cellulaires et ainsi bloquer le processus d'assemblage des particules virales (Blight *et al.*, 2000; Pietschmann *et al.*, 2002).

### ❖ *Pseudovirions et virosomes*

Le premier système de pseudovirions a été décrit en 1998 et appelé VLP<sup>37</sup>. La production de ces VLP a été réalisée en cellules d'insectes et basée sur l'utilisation de baculovirus recombinants qui expriment l'ensemble des protéines structurales du VHC (Baumert *et al.*, 1998). Ces VLP ont été utilisées afin d'étudier la structure et la fonction des glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 du virus, mais aussi les processus d'assemblage des particules et d'encapsidation de l'ARN viral (Choi *et al.*, 2004; Clayton *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2003). Le fait d'utiliser des cellules d'insectes induit un biais relatif à la

<sup>37</sup> *Virus Like Particles*

glycosylation de E1 et E2. En effet, les modifications acquises dans le système insecte ne sont pas les mêmes que dans les cellules de mammifères. Or, la glycosylation est essentielle au bon repliement des glycoprotéines d'enveloppe et offre une protection vis à vis des anticorps neutralisants (Falkowska *et al.*, 2007; Helle *et al.*, 2007; 2010). Un modèle correspondant au virus de la stomatite vésiculaire (VSV) pseudotypé avec E1 et E2 a également été décrit (Buonocore *et al.*, 2002; Lagging *et al.*, 1998; Matsuura *et al.*, 2001). Dans ce système, la limitation majeure résidait dans le fait que les protéines du VHC sont délétées de leur TM. Cette région est en effet essentielle à l'hétérodimérisation E1-E2 et à l'entrée du VHC (Ciczora *et al.*, 2005; 2007). Aussi, une étude a rapporté l'utilisation des pseudovirions basés sur un réplicon du virus de la forêt de Semliki (SVF<sup>38</sup>) exprimant les protéines structurales du VHC. Ce système a permis l'établissement du processus d'assemblage mais n'a pas donné lieu à une production efficace de particules infectieuses (Blanchard *et al.*, 2002).

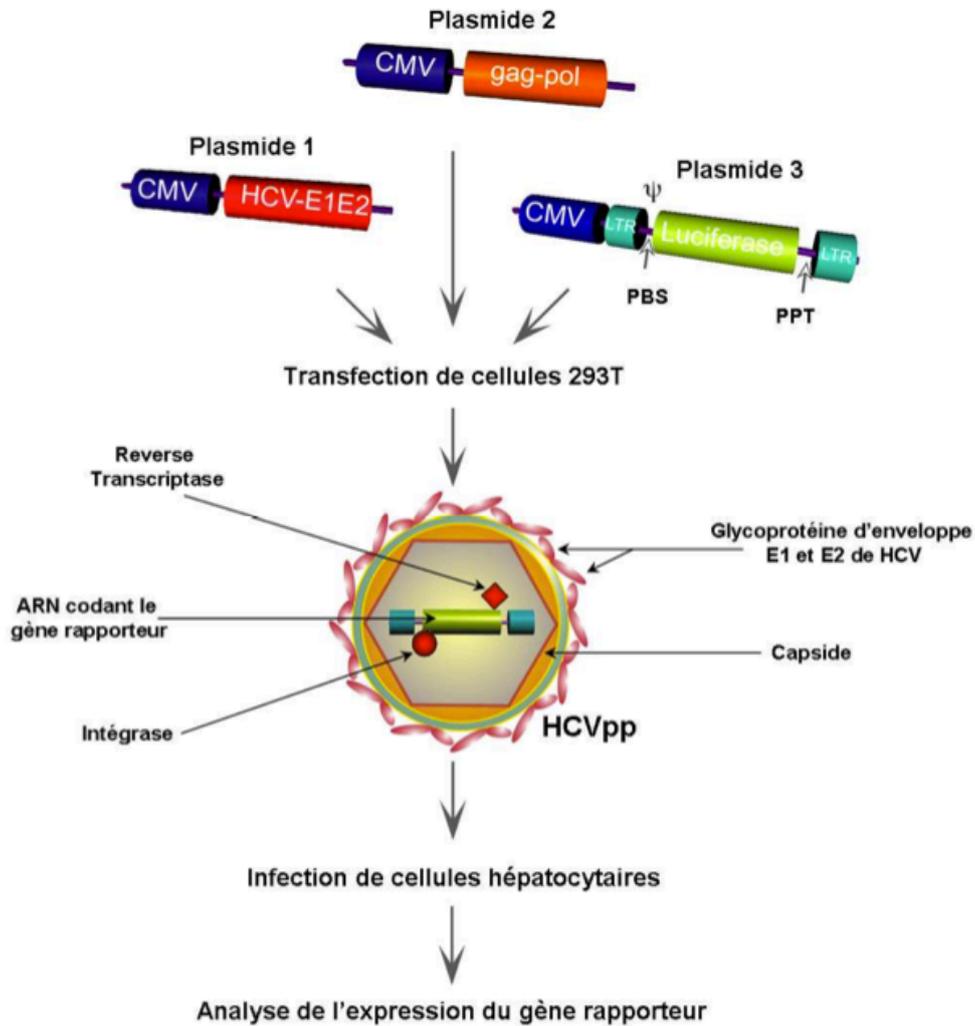
Afin d'étudier les phases précoces de l'entrée du VHC, les virosomes ont également été décrits. Il s'agit de vésicules lipidiques, des liposomes, dans lesquelles ont été incorporées les glycoprotéines d'enveloppe du VHC (Lambot *et al.*, 2002). Ces virosomes sont reconnus par des anticorps conformationnels et la protéine CD81, mais leur production est difficile.

### ❖ *Particules rétrovirales pseudotypées VHC*

En 2003, un nouvel outil a constitué un progrès majeur dans l'étude de l'étape d'entrée du VHC : les particules rétrovirales pseudotypées par les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 du VHC appelées VHCpp (Bartosch *et al.*, 2003c; Drummer *et al.*, 2003; Hsu *et al.*, 2003). Ce système exploite la capacité des rétrovirus à incorporer différentes glycoprotéines à leur surface et à délivrer une information génétique qui sera intégrée au génome de la cellule infectée. Les VHCpp sont donc des particules rétrovirales recombinantes qui consistent en une capsidie rétrovirale renfermant un ARN codant un gène rapporteur et entourée d'une enveloppe dans laquelle sont incorporées les glycoprotéines E1 et E2 du VHC.

---

<sup>38</sup> *Semliki Forest Virus*



**Figure 9 : Représentation schématique de la production de VHCpp**

Des cellules HEK-293T sont transfectées avec trois plasmides. Le premier code les protéines d'enveloppe E1 et E2 du VHC. Le second exprime les protéines codées par les gènes *gag* et *pol* d'un rétrovirus (MLV ou VIH). Le dernier, qui exprime le génome rétroviral contenant un gène rapporteur (ici, la luciférase), contient les séquences nécessaires à la transcription inverse et à l'intégration de l'ADN proviral dans le génome de la cellule (LTR, PBS, PPT) ainsi que le signal d'encapsidation  $\psi$ . Tous les plasmides sont sous contrôle d'un promoteur CMV. Les VHCpp produites sont sécrétées dans le milieu de culture. Elles sont ensuite utilisées pour infecter des cellules d'origine hépatique. La mesure de l'expression du gène rapporteur permet enfin de quantifier l'infection.

Afin de produire les VHCpp, trois plasmides sont transfectés dans des cellules embryonnaires humaines, les HEK-293T (**Figure 9**). Le premier plasmide exprime E1 et E2, la partie C-terminale de la protéine de capsid du VHC étant ajoutée à la construction pour servir de peptide signal à E1. Le deuxième exprime les protéines codées par les

gènes *gag* et *pol* du virus de la leucémie murine (MLV<sup>39</sup>) ou du VIH, responsable de la formation de la capsid. Enfin, le troisième plasmide exprime un génome rétroviral recombinant contenant un gène rapporteur qui code la protéine de fluorescence verte (GFP<sup>40</sup>) ou la luciférase. Les trois plasmides sont sous le contrôle d'un promoteur CMV<sup>41</sup>. Après la transfection des plasmides dans les cellules HEK-293T, les particules produites sont sécrétées dans le milieu extracellulaire et permettent une bonne transduction de cellules naïves, dépendamment des glycoprotéines présentes à leur surface. De plus, le génome rétroviral est intégré au génome cellulaire et l'infection est quantifiable grâce à la mesure de l'expression du gène rapporteur.

Les VHCpp constituent un bon outil pour l'étude de l'entrée du VHC, en terme d'attachement et de fusion des glycoprotéines d'enveloppe, mais également pour l'étude de la neutralisation par des anticorps. En effet, elles présentent un tropisme préférentiel pour les cellules hépatocytaires et autres lignées cellulaires exprimant les récepteurs du VHC (Bartosch *et al.*, 2003c; Hsu *et al.*, 2003; Lavillette *et al.*, 2005b). De plus, elles sont sensibles à la neutralisation par des anticorps anti-E1 ou anti-E2 et par des séras de patients infectés (Bartosch *et al.*, 2003b, c; Hsu *et al.*, 2003). Aussi, l'entrée des VHCpp est dépendante du pH, ce qui suggère des changements conformationnels des glycoprotéines d'enveloppe nécessaires au processus de fusion (Op de Beeck *et al.*, 2004). Enfin, les glycoprotéines de tous les génotypes du VHC peuvent être étudiées via le système des VHCpp (Lavillette *et al.*, 2005b; Owsianka *et al.*, 2005) et même des combinaisons de E1 et E2 de différents génotypes (Albecka *et al.*, 2011; Maurin *et al.*, 2011).

Avant la mise en place d'un système de production du VHC en culture cellulaire, les VHCpp ont représenté l'outil le plus proche des particules natives du virus. Cependant, elles constituent un outil imparfait dont l'utilisation est restreinte à l'étude des étapes précoces du cycle viral. Notamment, dans le cas du virus natif, la production a lieu en étroite association avec la voie d'assemblage et de sécrétion des VLDL (Huang *et al.*, 2007) et les particules produites sont associées aux lipoprotéines (Nielsen *et al.*, 2006). Ce n'est pas le cas pour les VHCpp étant donné qu'elles sont produites dans une

---

<sup>39</sup> *Murine Leukemia Virus*

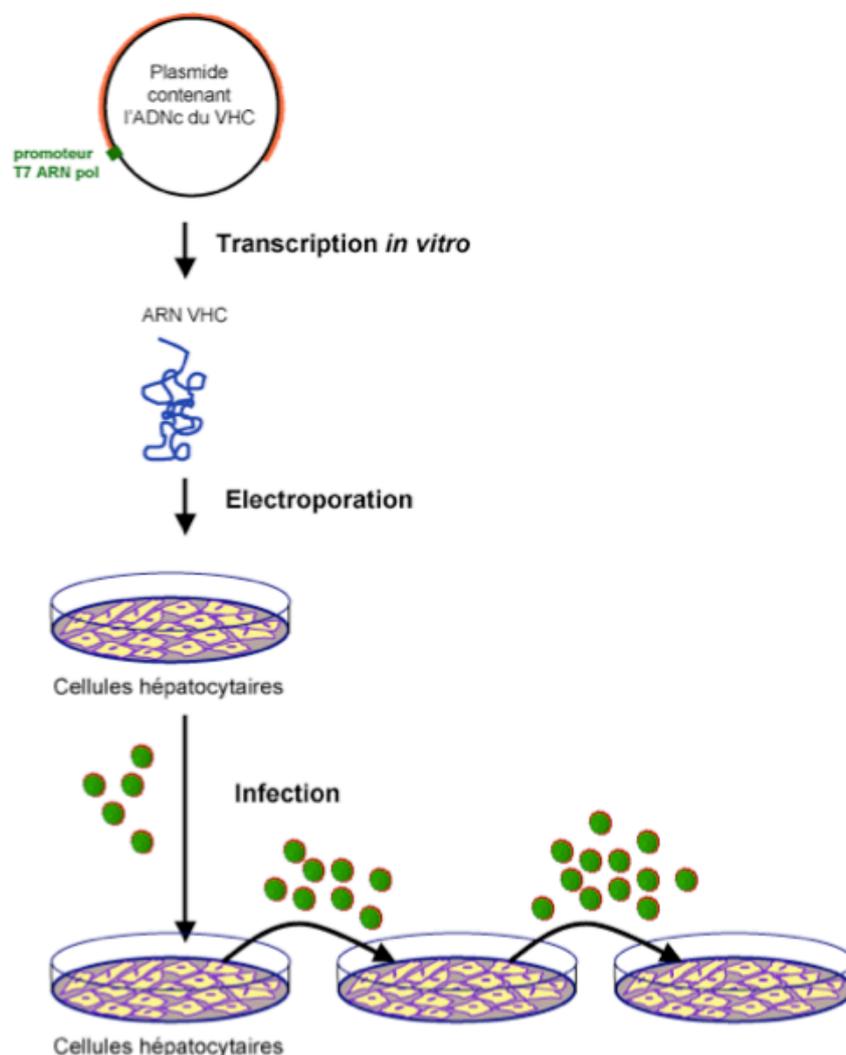
<sup>40</sup> *Green Fluorescent Protein*

<sup>41</sup> *Cytomegalovirus*

lignée non-hépatique qui ne possède pas cette voie d'assemblage et de sécrétion de VLDL.

### ❖ Production du VHC en culture cellulaire

Finalement en 2005, trois équipes ont décrit la mise au point d'un système de propagation du VHC en culture cellulaire (Lindenbach *et al.*, 2005; Wakita *et al.*, 2005; Zhong *et al.*, 2005), permettant de générer des particules virales similaires aux particules natives et ainsi d'étudier le cycle viral dans sa totalité.



**Figure 10 :** Représentation schématique du système de production des VHCc

L'ADNc du génome du VHC est porté par un plasmide sous la dépendance du promoteur T7. L'ADN est ensuite transcrit *in vitro* en un simple brin d'ARN viral de polarité positive grâce à la T7 RNA polymérase. Cet ARN est ensuite électroporé dans les cellules Huh-7. Les cellules transfectées produisent alors des particules virales infectieuses VHC. Ces VHCc sont sécrétées dans le surnageant de culture et sont capables d'infecter des cellules naïves. Il est possible d'amplifier le stock viral par la réalisation d'infections successives.

En 2001, un ARN fut cloné à partir d'un isolat de génotype 2a isolé chez un patient japonais atteint d'une hépatite fulminante (Kato *et al.*, 2001). Cette souche a été appelée JFH-1. Sous forme de réplicon sous-génomique, il a été montré que cette souche se réplique dans les cellules Huh-7 sans mutation d'adaptation (Kato *et al.*, 2003). A partir de là, Wakita et collaborateurs ont pu générer des particules virales produites en culture cellulaire ou VHCcc. Ils ont cloné l'ADN complémentaire (ADNc) de l'intégralité du génome du JFH-1 en le mettant sous la dépendance du promoteur T7 afin de permettre la transcription *in vitro* de l'ARN viral. Après cette étape de transcription et afin de générer les VHCcc, l'ARN est électroporé dans des cellules Huh-7 (**Figure 10**). Les VHCcc sont alors produites et sécrétées dans le milieu de culture et sont capables d'infecter des cellules naïves (Wakita *et al.*, 2005). De meilleurs titres infectieux sont obtenus avec les cellules Huh-7.5 et Huh-7.5.1, déjà évoquées et décrites au cours de ce travail (Lindenbach *et al.*, 2005; Zhong *et al.*, 2005). Il a été montré que les VHCcc sont également infectieuses sur des hépatocytes primaires humains, des chimpanzés et des souris humanisées (Lindenbach *et al.*, 2006). D'ailleurs, une étude de 2010 a décrit la production de particules virales infectieuses par des hépatocytes primaires humains préalablement infectés par des VHCcc produites en Huh-7 (Podevin *et al.*, 2010). Aussi, des cellules hépatocytaires naïves sont infectables par le VHC issu de sera de chimpanzés infectés par des VHCcc (Lindenbach *et al.*, 2006; Molina *et al.*, 2008). Enfin, des sera de patients ou des anticorps anti-E2 permettent la neutralisation des VHCcc (Lindenbach *et al.*, 2005; Wakita *et al.*, 2005; Zhong *et al.*, 2005). De manière intéressante, de nombreuses études ont rapporté l'identification de mutations d'adaptation des VHCcc (Boson *et al.*, 2011; Delgrange *et al.*, 2007; Grove *et al.*, 2008; Han *et al.*, 2009; Kang *et al.*, 2009; Kato *et al.*, 2008; Kaul *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2012; Russel *et al.*, 2008; Saeed *et al.*, 2011; Song *et al.*, 2012; Tao *et al.*, 2009). Par exemple dans le laboratoire, afin d'améliorer l'infectiosité du JFH-1, Delgrange et collaborateurs ont réalisé des expériences d'infections successives de Huh-7, menant à l'adaptation du virus et permettant de sélectionner des mutations importantes pour sa propagation en culture cellulaire. La réintroduction de ces adaptations dans l'ARN parental s'est montrée efficace dans l'augmentation des titres viraux (Delgrange *et al.*, 2007).

Outre le 2a, d'autres génotypes peuvent être utilisés afin de produire des VHCcc (kato *et al.*, 2007; Yi & Lemon, 2009; Yi *et al.*, 2006). Cependant, les titres viraux sont bien moins élevés que ceux obtenus avec le JFH-1. Aussi, des virus chimériques ont été

générés afin de coupler l'efficacité de réplication du JFH-1 et la possibilité d'étudier d'autres génotypes. Pour cela en général, le génome du JFH-1 est conservé des protéines NS3 à NS5B, le reste du génome provenant d'un autre génotype (Gottwein *et al.*, 2009; Lindenbach *et al.*, 2005; Pietschmann *et al.*, 2006). Ces virus chimériques sont produits en culture cellulaire à des titres raisonnables. Par ailleurs, un gène rapporteur codant pour la luciférase peut être ajouté en amont de l'ADNc du JFH-1 afin de pouvoir quantifier le niveau d'infection. Cette construction, typiquement bicistronique, est répliquée dans les cellules Huh-7 à des niveaux inférieurs à ceux obtenus avec le souche native, mais suffisamment pour bénéficier d'un outil d'analyse quantitative de l'infection (Koutsoudakis *et al.*, 2006).

Les particules virales produites en culture cellulaire ont des propriétés biophysiques proches de celles du virus isolé de patients ou de chimpanzés infectés. Le diamètre des VHCcc a été évalué en microscopie électronique et semble compris entre 50 et 65 nm. De plus, il a été montré que les VHCcc sont associées à des lipoprotéines (Gastaminza *et al.*, 2008; 2010). Cependant, des différences subsistent puisque par exemple, le VHC produit en culture cellulaire est retrouvé dans des fractions de densité plus élevées que le virus natif (Gastaminza *et al.*, 2006; Lindenbach *et al.*, 2006).

Entre autre, grâce aux VHCcc, il a été possible d'étudier le phénomène de « sur-infection », c'est-à-dire la réinfection d'une même cellule par le virus. Différentes études montrent que, une fois la cellule infectée par le VHC, la « sur-infection » est inhibée (Schaller *et al.*, 2007; Tscherne *et al.*, 2007). Désormais et depuis 2005, les VHCcc représentent un modèle de choix afin d'étudier toutes les étapes du cycle viral et sont à ce titre largement utilisées.

## **b) Les modèles animaux**

### **❖ Le chimpanzé**

En conditions naturelles, le VHC n'infecte que les humains. D'un point de vue expérimental, le chimpanzé constitue le seul modèle animal immunocompétent infectable de manière reproductible par le VHC. Le chimpanzé infecté par le VHC présente une pathogenèse, des mécanismes de défense immunitaire et des signes cliniques comparables à ceux observés chez les humains. Toutefois, un certain nombre

de différences persistent puisque la sévérité de la maladie est souvent moins importante que chez l'Homme et la réponse immunitaire atténuée (Bassett *et al.*, 1998; 1999). De plus, il a été montré que l'animal infecté ne répondait pas au traitement par l'IFN- $\alpha$  (Lanford *et al.*, 2007). Initialement, le chimpanzé a été utilisé pour l'étude des hépatites « Non A – Non B » post-tranfusionnelles, dans des expériences d'inoculation avec des sera de patients chroniquement infectés (Alter *et al.*, 1978; Hollinger *et al.*, 1978). Par la suite, l'inoculation de l'ARN du VHC, obtenu par transcription *in vitro* de l'ADNc, s'est avéré infectieux chez le chimpanzé (Kolykhalov *et al.*, 1997; Shimizu *et al.*, 1998; Yanagi *et al.*, 1997). Et plus récemment, depuis la mise en place du système de production des particules virales en culture cellulaire, l'infectiosité des VHCcc a été confirmée *in vivo* chez le chimpanzé (Wakita *et al.*, 2005).

Ce modèle animal présente un certain nombre de limitations qui restreignent son utilisation. Notamment, c'est un modèle animal rare et son entretien coûte très cher. De plus, il s'agit d'un animal protégé dont l'utilisation pose des problèmes éthiques (Koike *et al.*, 2010). Cependant, le chimpanzé reste un modèle de choix dans l'étude *in vivo* du VHC et est par exemple utilisé afin de tester de potentiels agents antiviraux ou vaccins, mais également pour mieux comprendre les mécanismes immunitaires mis en jeu lors de l'infection.

### ❖ *Les souris humanisées*

Aux vues des inconvénients liés à l'utilisation du chimpanzé au cours des études expérimentales, des alternatives sont étudiées afin de mettre en place un modèle animal de plus petite taille. Deux possibilités majeures s'offrent ainsi aux scientifiques : adapter le virus à l'infection de cellules d'origine non-humaine ou générer de petits animaux, plus généralement des souris, infectables par le VHC.

La première alternative est difficile à mettre en place. En effet, il a été suggéré que le tropisme du VHC pourrait être restreint non-seulement à l'étape d'entrée, notamment par les récepteurs CD81 et Occludine (OCLN) qui doivent être d'origine humaine (Ploss *et al.*, 2009), mais aussi à des étapes plus tardives du cycle viral par des facteurs intracellulaires (McCaffrey *et al.*, 2002). Bien que des études montrent la possibilité d'adapter le VHC aux étapes d'entrée et de réplication dans des cellules murines, les étapes d'assemblage et de sécrétion des particules virales restent bloquées

dans ces modèles (Bitzegeio *et al.*, 2010; Flint *et al.*, 2006; Ploss *et al.*, 2009; Uprichard *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2003). De plus, une étude récente a montré que l'humanisation des récepteurs d'entrée du VHC ne suffit pas à infecter des hépatocytes murins (Hikosaka *et al.*, 2011).

L'autre possibilité, qui est de rendre infectables des souris par le VHC, est devenue réalité en 2001 avec la première description de souris au foie humanisé (Mercer *et al.*, 2001). Ce modèle consiste en la destruction du foie de souris immunodéprimées (SCID<sup>42</sup>). Pour cela, un transgène activateur d'urokinase plasminogène (uPA<sup>43</sup>) est surexprimé sous la dépendance du promoteur de l'albumine qui dirige l'expression du gène dans le foie. Le foie de l'animal uPA/SCID ainsi détruit est recolonisé par des hépatocytes humains suite à une xénogreffe. Ces souris peuvent ensuite être infectées par le VHC (Mercer *et al.*, 2001; Meuleman *et al.*, 2005; Vanwolleghem *et al.*, 2010). Un autre modèle de souris immunodéficientes au foie humanisé a été décrit récemment (Bissig *et al.*, 2010). Elles sont dépourvues de trois gènes (Fah<sup>44</sup>, Il-2 $\gamma$ <sup>45</sup>, Rag2<sup>46</sup>) et la recolonisation du foie par les hépatocytes humains est plus efficace et donne lieu à un meilleur taux de chimérisme. En effet, jusqu'à 95% des cellules du foie sont d'origine humaine chez ces animaux. Le problème majeur de ce type de souris humanisées immunodéficientes réside dans l'impossibilité d'étudier la réponse immunitaire adaptative dans le cadre de l'infection par le VHC. Aussi, une grande variabilité dans l'efficacité des xénogreffes en fonction des animaux ainsi que les techniques pointues de chirurgie nécessaires à l'établissement de ces souris limitent leur utilisation. Toutefois, elles permettent par exemple l'évaluation de composés antiviraux, de stratégies thérapeutiques ou encore du potentiel de neutralisation d'anticorps (Bukh, 2012; Ploss & Rice, 2009).

En 2011, deux modèles de souris au foie humanisé ont été rapportés et, de manière intéressante, ils ouvrent la voie à l'étude de l'immunité en modèle murin. La première étude décrit une humanisation des récepteurs nécessaires à l'entrée du VHC dans le contexte de souris immunocompétentes (Dorner *et al.*, 2011). Grâce à un gène

---

<sup>42</sup> *Severe Combined Immuno Deficiency*

<sup>43</sup> *urokinase-type Plasminogen Activator*

<sup>44</sup> *Fumaryl acetoacetate hydrolase*

<sup>45</sup>  *$\gamma$ -chain of the receptor for IL-2*

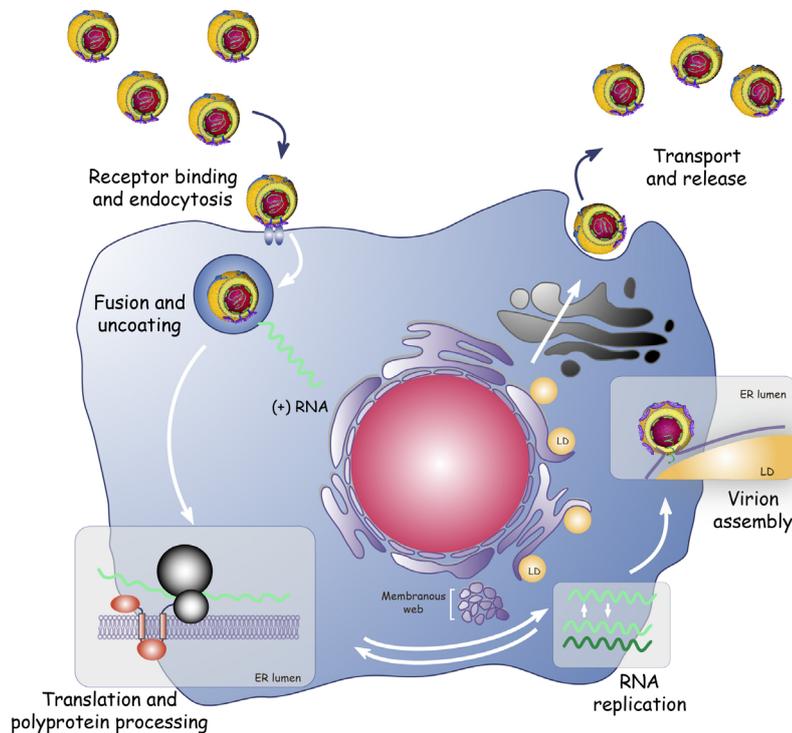
<sup>46</sup> *Recombination activating gene 2*

rapporteur, en l'occurrence la luciférase, l'entrée du virus peut être évaluée dans ce modèle. Cependant, aucune répllication ni production virale n'a été mise en évidence. Ces souris permettent l'étude de l'entrée du VHC, mais également des mécanismes immunitaires et de stratégies vaccinales. Le deuxième modèle a été rapporté par Washburn et collaborateurs (Washburn *et al.*, 2011). Les souris sont greffées avec des cellules souches hématopoïétiques et des cellules progénitrices hépatocytaires. Cela permet la recolonisation du foie des souris par les hépatocytes humains, en parallèle de la reconstitution d'une réponse T-cellulaire. Après inoculation des souris avec des sera de patients infectés, l'ARN viral est détectable dans le foie d'environ la moitié des animaux, associé à des infiltrations de cellules immunitaires, une augmentation du taux des enzymes du foie, et des signes d'hépatite. Certaines souris présentent même une fibrose hépatique. Outre le fait que le cycle viral ne semble pas se dérouler dans sa totalité puisqu'aucune particule virale n'a pu être détectée dans le sang des animaux, une limitation majeure de ce modèle est l'absence de cellules B fonctionnelles et donc le manque de production d'anticorps spécifiques dirigés contre le VHC. Malgré les limitations et inconvénients évoqués, ces modèles immunocompétents représentent une avancée majeure pour l'étude *in vivo* des aspects moléculaires, thérapeutiques et immunitaires de l'infection par le VHC.

## 5. Le cycle viral

Le cycle viral du VHC se compose de différentes étapes nécessaires à l'infection et est régulé par des facteurs viraux et cellulaires (Pawlotsky *et al.*, 2007). Brièvement, le virus est dans un premier temps concentré à la surface de la cellule via des facteurs d'attachement non-spécifiques (**Figure 11**). Il interagit ensuite de manière séquentielle avec des récepteurs spécifiques ancrés dans la membrane plasmique de la cellule hôte. Il s'en suit l'internalisation du virus, via une voie d'endocytose dépendante de la clathrine. Le pH acide des endosomes permet la fusion des membranes virale et cellulaire, notamment médiée par un changement de conformation des glycoprotéines d'enveloppe du VHC. L'ARN viral est ainsi libéré dans le cytoplasme et il est traduit en une polyprotéine unique qui sera clivée pour donner naissance aux protéines virales matures. Les protéines non-structurales participeront à la répllication du génome au niveau du « *membranous web* ». Les particules virales sont enfin assemblées en

association avec les GLs, et elles seront sécrétées dans le milieu extracellulaire en suivant la voie de sécrétion des VLDL (Popescu & Dubuisson, 2010).



**Figure 11 : Cycle viral putatif du VHC**

Dans un premier temps le virus se lie à la surface de la cellule cible via les facteurs d'attachement et d'entrée. Le virion est ensuite internalisé par une voie d'endocytose dépendante de la clathrine. Une fois dans la cellule, l'enveloppe virale fusionne avec la membrane endosomale et l'ARN viral est libéré dans le cytoplasme. L'ARN du VHC sert alors à la synthèse des protéines virales et est utilisé comme matrice pour la réplication du génome viral, en passant par un intermédiaire brin négatif. Les protéines structurales servent ensuite à l'assemblage de nouvelles particules virales. L'assemblage et l'encapsidation sont associés aux gouttelettes lipidiques. Enfin les virions sont sécrétés en dehors de la cellule.

### a) Attachement, internalisation et fusion

La première étape du cycle viral est l'entrée. Pour pénétrer dans la cellule, le VHC utilise d'abord des facteurs cellulaires d'attachement, tels que les lectines, les glycosaminoglycanes (GAGs), les LDL-R. Ensuite, l'interaction avec des récepteurs spécifiques mène à l'internalisation de la particule virale et enfin la fusion des membranes endosomale et virale pour libérer le génome dans le cytoplasme. Parmi les facteurs d'entrée spécifiques, on trouve SRB1, CD81, Claudine-1 (CLDN-1) et OCLN, ainsi que d'autres molécules plus récemment décrites.

Puisque mon travail de thèse porte sur cette étape d'entrée virale, un paragraphe séparé est spécifiquement dédié à ce sujet (**Partie I.C**).

### **b) Synthèse des protéines virales**

Après fusion des membranes virale et cellulaire et décapsidation, le génome viral est relargué dans le cytoplasme de la cellule infectée. L'ARN viral se comporte alors comme un ARN messager (ARNm) et sert directement à la traduction de la polyprotéine. Pour l'initiation de la traduction, aucun facteur viral n'est nécessaire étant donné que le virus détourne la machinerie cellulaire. La traduction est donc initiée grâce à l'IRES, qui constitue la majeure partie de l'extrémité 5'NC de l'ARN du VHC (Tsukiyama-Kohara *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 1993). Dans un premier temps, la sous-unité 40S ribosomale se fixe au niveau du codon initiateur AUG. Ensuite, le facteur d'initiation eIF3<sup>47</sup>, l'ARN de transfert, eIF2<sup>48</sup> et le GTP sont recrutés et la sous-unité ribosomale devient 48S. Enfin, la sous-unité 60S du ribosome vient s'ajouter et termine la formation du complexe de traduction complet, permettant à la traduction de débuter (Hoffman & Liu, 2011). La traduction du peptide signal de la protéine virale E1, situé à l'extrémité C-terminale de la protéine de capsid, dirige la polyprotéine naissante au niveau du RE. La traduction a donc lieu en étroite association avec les membranes du RE. Finalement, afin de générer les protéines virales matures, la polyprotéine est clivée co- et post-traductionnellement par des protéases cellulaires et virales (**Figure 7**).

### **c) Réplication du génome viral**

L'ARN du virus sert également de matrice au processus de réplication. Pour cela, un brin d'ARN complémentaire à l'ARN viral et de polarité négative est généré, via la production d'intermédiaires de réplication, formés d'ARN doubles brins (Targett-Adams *et al.*, 2008). A partir de là, de nouveaux brins positifs sont produits et peuvent servir de matrice soit pour la synthèse de nouvelles protéines virales, soit pour la réplication du génome. Aussi, ils peuvent être encapsidés afin de produire de nouveaux virions. Il est intéressant de noter que la réplication est asymétrique, puisque cinq à dix fois plus de

---

<sup>47</sup> *eukaryotic Initiation Factor 3*

<sup>48</sup> *eukaryotic Initiation Factor 2*

brins positifs sont générés (Lohmann *et al.*, 1999). Il semble que la balance entre traduction et réplication soit régulée par les extrémités 5' et 3' NC ainsi que par des facteurs cellulaires et viraux.

Les sites de réplication du VHC sont situés au niveau des « *membranous web* », structures membranaires dérivant du RE et induites par l'infection par le VHC (Gosert *et al.*, 2003). Le complexe de réplication comprend l'ARN viral, les protéines non-structurales NS3 à NS5B, et des facteurs cellulaires. NS2 ne semble pas jouer de rôle dans le processus de réplication puisque des réplicons dépourvus de cette protéine sont fonctionnels. Le rôle de chaque protéine virale au sein du complexe de réplication n'est pas totalement élucidé. NS5B porte l'activité réplase et sert à la synthèse des brins négatifs et positifs d'ARN (Bartenschlager *et al.*, 2004). NS4B est la protéine responsable de la formation du « *membranous web* » (Egger *et al.*, 2002). NS4A adresse NS3 aux membranes cellulaires et régule son activité protéasique. NS3, possédant également une activité hélicase, pourrait servir à dénouer les structures secondaires et séparer les doublets d'ARN. Enfin, le rôle de NS5A reste mal connu. Cette protéine peut lier l'ARN ainsi que d'autres protéines virales, dont NS5B, et il semble qu'elle constitue un élément clé de la régulation du passage de la réplication à la traduction, notamment via son niveau de phosphorylation (Appel *et al.*, 2005; Tellinghuisen *et al.*, 2008a). Parmi les facteurs cellulaires capables de réguler l'activité du complexe de réplication, on peut par exemple citer les cyclophilines (Chatterji *et al.*, 2010; Kaul *et al.*, 2009), la PRK2 (Kim *et al.*, 2004) ou encore GBF1<sup>49</sup> (Goueslain *et al.*, 2010).

#### d) Assemblage et sécrétion

Les étapes d'assemblage et de sécrétion des particules virales sont les moins bien décrites mais la mise en place du système de production des VHCcc a permis de mieux comprendre ces processus.

Au début de l'étape d'assemblage, la protéine de capsid est concentrée au niveau des GLs. Pour cela, elle est clivée et subit une relocalisation des membranes du RE vers les GLs (Depla *et al.*, 2010; McLauchlan *et al.*, 2002). Ensuite, les brins d'ARN à encapsider se retrouvent à proximité des GLs et donc des protéines de capsid (**Figure 12**). L'une des hypothèses quant à ce mécanisme est la suivante : les complexes de

---

<sup>49</sup> *Golgi-associated Brefeldin A-resistant Factor 1*

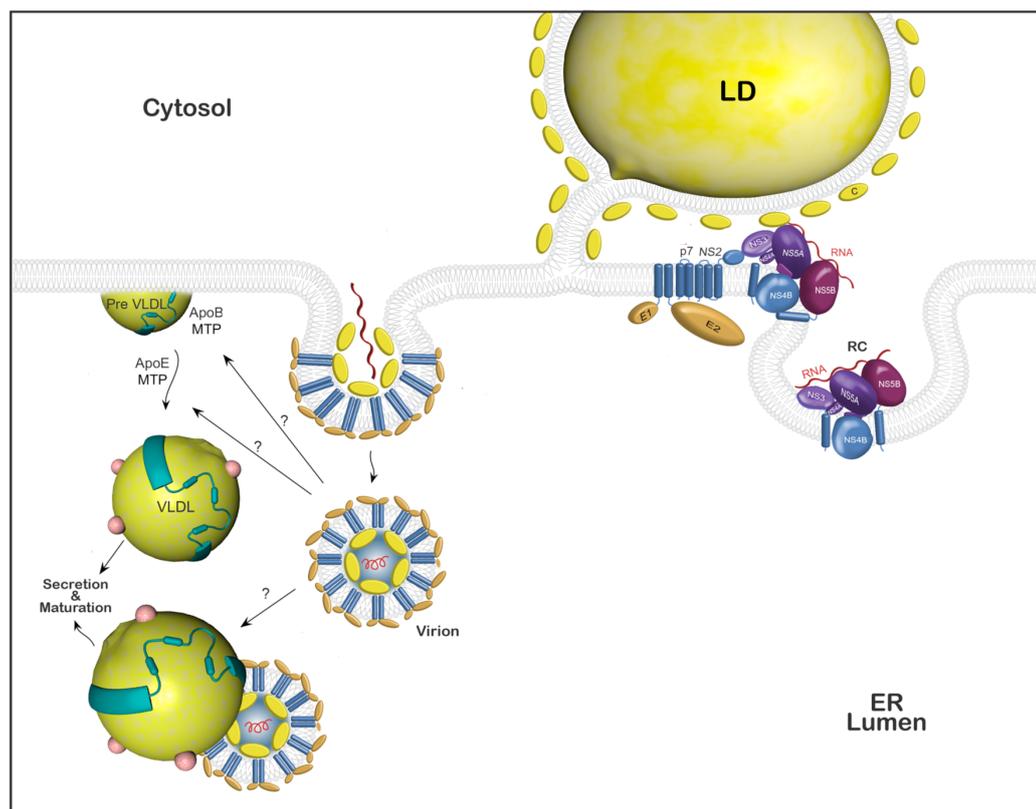
réplication seraient transportés jusqu'au GLs, via les microtubules et via des interactions de NS3 et NS5A avec l'actine et la tubuline (Lai *et al.*, 2008). La deuxième hypothèse réside dans le fait qu'à l'inverse, les GLs seraient recrutées au niveau des complexes de réplication, via des interactions protéines de capsid-microtubules (Boulant *et al.*, 2008). Quoiqu'il en soit, il est clair que la protéine NS5A est essentielle à l'initiation de l'assemblage des particules virales (Appel *et al.*, 2008; Masaki *et al.*, 2008; Miyanari *et al.*, 2007). D'autres protéines non-structurales jouent un rôle lors de l'assemblage. Notamment, la protéine NS3 est également localisée au niveau des GLs lors de l'infection par le VHC (Miyanari *et al.*, 2007) et semble importante dans la production de particules virales infectieuses, plus précisément pour l'étape d'encapsidation de l'ARN viral (Ma *et al.*, 2008; Yi *et al.*, 2007). De plus, alors que NS2 n'apparaît pas comme essentielle à la réplication virale, elle semble importante à une étape tardive de l'assemblage (Dentzer *et al.*, 2009; Jirasko *et al.*, 2008; Jones *et al.*, 2007; Yi *et al.*, 2009). Il a par exemple été montré qu'une mutation dans la séquence de NS2 qui empêche la production de particules virales infectieuses ne bloque pas l'association de NS3, NS5A et la protéine de capsid avec les GLs, ni l'oligomérisation de la protéine de capsid, ni la formation de particules intracellulaires (Yi *et al.*, 2009). De plus, NS2 interagit aussi bien avec des protéines structurales que non-structurales et jouerait le rôle de médiateur entre ces différentes protéines pour réguler le processus d'assemblage (Ma *et al.*, 2011; Popescu *et al.*, 2011; Yi *et al.*, 2009). Enfin, outre NS5A, NS3 et NS2, plusieurs études rapportent la participation de la protéine p7 au cours des processus d'assemblage et de sécrétion (Brohm *et al.*, 2009; Jones *et al.*, 2007; Steinmann *et al.*, 2007). Son rôle précis reste cependant inconnu, mais un modèle récent propose que, entre autre, l'interaction entre p7 et NS2 régule le processus d'assemblage (Popescu *et al.*, 2011).

De manière intéressante, les particules virales sécrétées en culture cellulaire ou circulantes dans le sang des patients infectés sont sous forme de LVP, c'est-à-dire associées à des VLDL, riches en ApoB et ApoE (Andre *et al.*, 2002; Chang *et al.*, 2007; Gastaminza *et al.*, 2006). De plus, les compartiments cellulaires associés à la réplication et à l'assemblage du VHC montrent la présence de ApoB, ApoE et du MTP<sup>50</sup>, un facteur essentiel à la production des VLDL (Gastaminza *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2007). Ces observations convergent vers un mécanisme commun d'assemblage et de sécrétion du virus et des VLDL. Plusieurs équipes ont d'ailleurs testé le rôle d'ApoB, ApoE et du MTP

---

<sup>50</sup> *Mitochondrial Triacylglycerol transfer Protein*

dans le processus d'assemblage. Bien que controversées, certaines études montrent que l'inhibition de la production d'ApoB et ApoE, de même que le blocage de l'activité du MTP, diminuent la production de particules virales infectieuses (Benga *et al.*, 2010; Gastaminza *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2007; Jiang & Luo, 2009). Au cours de la voie de sécrétion, les particules virales voient leur densité diminuer ce qui semble dû à la lipodation de la partie lipoprotéique des LVP le long de la voie de sécrétion (Gastaminza *et al.*, 2006). Il apparaît donc que la voie d'assemblage et de sécrétion de VLDL soit importante pour la maturation intracellulaire des virions. De plus, Gastaminza et collaborateurs proposent que les particules virales soient dégradées si la maturation (et notamment l'ajout de lipides) n'est pas correcte (Gastaminza *et al.*, 2008). L'ensemble de ces études concoure à montrer l'importance de la voie d'assemblage et de sécrétion des VLDL dans la morphogénèse du VHC et apporte une explication quant à l'association des particules virales avec des lipoprotéines *in vivo*.



**Figure 12** : Modèle d'assemblage des particules du VHC (d'après Tews *et al.*, 2010)

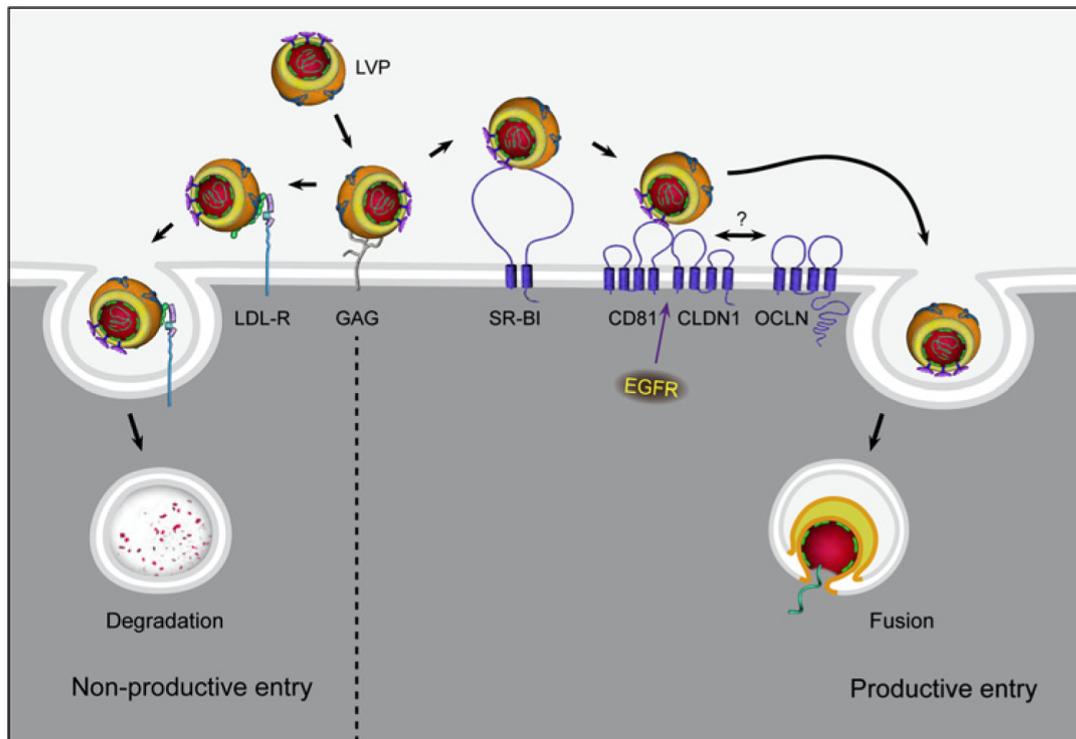
Les particules virales commencent à être assemblées dans le cytosol. La protéine de capsid (ici en jaune) s'accumule au niveau des GLs (LD). Les complexes de réplication sont également recrutés au niveau des GLs via des interactions entre la protéine de capsid et les protéines non-structurales. Ceci amène à l'encapsidation de l'ARN génomique du VHC. Par la suite la nucléocapside néoformée bourgeonne au niveau de la membrane du RE et peut ainsi acquérir son enveloppe virale (composée de la membrane du RE dans laquelle sont ancrées les glycoprotéines E1 et E2). Enfin la maturation des particules virales se fait en association à la voie d'assemblage des VLDL.

La **figure 12** représente le modèle actuel du processus d'assemblage du VHC (Tews *et al.*, 2010) et décrit l'enveloppement des particules virales par bourgeonnement dans la membrane du RE, suivi par une maturation du virus le long de la voie d'assemblage des VLDL. Les virus néoformés quitteraient finalement la cellule par exocytose en suivant la voie de sécrétion.

### C. L'entrée du VHC

L'entrée du VHC dans les cellules est un processus complexe et séquentiel, qui met en jeu d'une part des composants viraux, tels que les lipoprotéines et les glycoprotéines d'enveloppe, mais également un certain nombre de facteurs cellulaires, le rôle précis de chaque molécule étant encore mal connu.

Pour entrer dans la cellule, le VHC se lie d'abord de manière non-spécifique à la surface cellulaire grâce à des facteurs d'attachement. Après une série d'interactions plus spécifiques avec les facteurs d'entrée proprement dits, le virus est internalisé via une voie dépendante de la clathrine. Afin que le génome viral soit libéré dans le cytoplasme de la cellule, une étape de fusion est nécessaire. Pour cela, un pH acide est essentiel et induit le changement de conformation des glycoprotéines d'enveloppe indispensable à ce processus. C'est l'acidité des endosomes qui permet donc aux membranes virale et endosomale de fusionner, permettant au génome de gagner le cytosol de la cellule. L'étape d'entrée ainsi achevée, l'ARN viral est prêt à être traduit et répliqué (**Figure 13**).



**Figure 13** : Modèle de l'entrée du VHC (D'après Ploss & Dubuisson, 2012)

Les LVP interagissent avec les GAGs et suivent soit une voie non-productive, soit une voie productive pour l'entrée virale. Dans la voie non-productive, le virus interagit avec le LDL-R via sa partie lipoprotéique, il est internalisé et dirigé vers une voie de dégradation. La voie productive est plus complexe et implique des facteurs cellulaires tels que SRB1, CD81, CLDN-1, OCLN et EGFR. Après une série séquentielle d'interactions à la surface cellulaire, le virus est internalisé par une voie dépendante de la clathrine et la fusion des membranes dans les endosomes permet de libérer le génome viral dans le cytoplasme de la cellule.

Il est important de noter que, à la manière d'autres virus tels que le VIH (Johnson & Hubert, 2002), le VHC utilise deux voies d'entrée pour infecter les cellules. La première voie est la plus décrite et elle consiste en une infection via des particules libres. C'est-à-dire que les particules virales sont présentes dans le milieu extracellulaire et pénètrent la cellule en suivant le processus décrit précédemment, qui est médié par les récepteurs spécifiques (attachement-internalisation-fusion). La deuxième voie d'entrée du VHC est la transmission directe de cellule à cellule, sans passer par l'étape de particules libres sécrétées dans le milieu (Timpe *et al.*, 2008). La prise en compte de ce passage de cellule à cellule du virus, qui semble être la voie majoritaire de transmission du VHC, est notamment importante dans les études relatives aux aspects thérapeutiques.

## 1. Les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2

Les glycoprotéines d'enveloppe du VHC sont essentielles au processus d'entrée du virus dans les cellules cibles (Cocquerel *et al.*, 2006). Elles servent à la fois à l'interaction avec les récepteurs de l'entrée, mais sont aussi les médiateurs de la fusion des membranes dans les endosomes. De plus, E1 et E2 jouent un rôle lors de l'assemblage des particules virales (Wakita *et al.*, 2005).

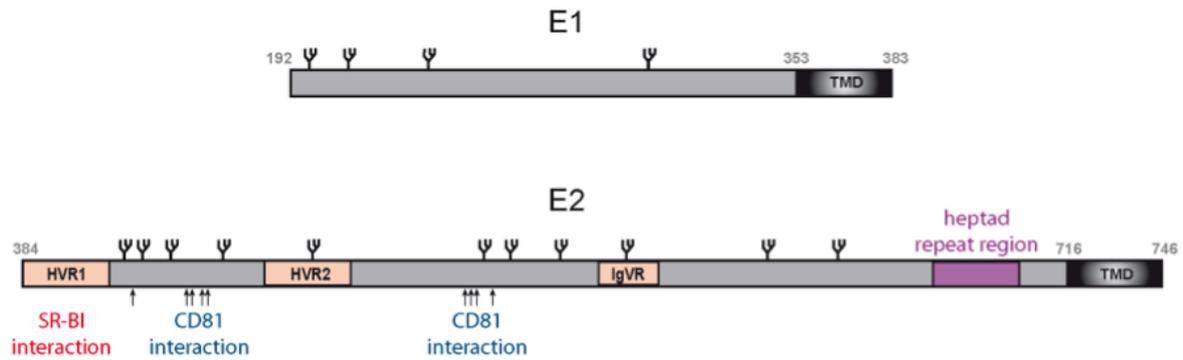
Les glycoprotéines d'enveloppe font partie des protéines structurales du VHC. E1 et E2 sont respectivement codées par les résidus 192 à 383 et 384 à 746 de la polyprotéine virale (**Figure 14**). Une fois matures, elles font respectivement, 31 et 70 kDa et sont hautement N-glycosylées (Grakoui *et al.*, 1993). Ce sont des peptidases signal cellulaires qui libèrent E1 et E2 de la polyprotéine (Dubuisson *et al.*, 2002). Les glycoprotéines d'enveloppe sont des protéines de type 1 : elles possèdent un ectodomaine N-terminal glycosylé en plusieurs sites et, en C-terminal, un TM à un seul passage. Au cours de la biogenèse de E1 et E2, les ectodomains sont transloqués dans la lumière du RE et y subissent des modifications post-traductionnelles. Egaleme nt, E1 et E2 s'associent dans le RE et forment à la fois des hétérodimères non-covalents et des complexes hétérogènes liés par des ponts disulfures. Les complexes non-covalents ont été décrits comme étant la forme fonctionnelle pour l'entrée du virus (Bartosch *et al.*, 2003c; Deleersnyder *et al.*, 1997; Op de Beeck *et al.*, 2004). Cependant, les complexes E1E2 ont été récemment étudiés dans le contexte des VHCcc et cette étude a montré que

les glycoprotéines incorporées dans l'enveloppe des particules virales infectieuses forment en fait de larges complexes covalents stabilisés par des ponts disulfures (Vieyres *et al.*, 2010). Il a été montré que E1 est important pour la mise en conformation de E2 (Brazzoli *et al.*, 2005; Cocquerel *et al.*, 2001; Michalak *et al.*, 1997) et que, à un degré moindre, E2 aide à la conformation de E1 (Cocquerel *et al.*, 2003b). Les TM de ces glycoprotéines sont multifonctionnels. En effet, ils servent à l'ancrage membranaire des protéines, sont responsables de leur rétention au niveau du RE et sont impliqués dans l'hétérodimérisation E1E2 (Ciczora *et al.*, 2005; Cocquerel *et al.*, 1998; 1999; 2000). Un motif « heptad repeat » de leucine en C-terminal de E2 pourrait également participer à cette hétérodimérisation (Drummer & Pountourios, 2004) (**Figure 14**). De plus, des mutations dans les TM de E1 et de E2 modifient les propriétés de fusion des glycoprotéines d'enveloppe, mettant en évidence leur implication dans le processus de fusion (Ciczora *et al.*, 2007).

E2 contient une région HVR1, de 27 acides aminés et située en N-terminal de la protéine (**Figures 14 et 15**). Les propriétés physico-chimiques et la conformation spatiale de cette région semblent bien conservées au travers des différents génotypes du VHC (Penin *et al.*, 2001). Cependant et comme son nom l'indique, sa séquence présente une haute variabilité au sein des génotypes mais également au sein des différentes quasi-espèces virales retrouvées chez les patients (Korenaga *et al.*, 2001; Polyak *et al.*, 1998). En cela, la région HVR1 participerait à la capacité du virus à échapper au système immunitaire de l'hôte et jouerait également un rôle dans la résistance à l'IFN (Abbate *et al.*, 2004; Grahovac *et al.*, 2000; Pawlotsky *et al.*, 1999). Cette région a aussi été montrée comme importante pour l'interaction avec SRB1 (Bartosch *et al.*, 2003a; Callens *et al.*, 2005; Scarselli *et al.*, 2002). Deux autres régions variables sont présentes dans la séquence de E2 (**Figures 14 et 15**) : HVR2 et IgVR<sup>51</sup>. Le rôle de HVR2 est encore inconnu mais il a été suggéré qu'en association avec HVR1, ce domaine pourrait réguler la liaison à CD81 (Roccasecca *et al.*, 2003). La région IgVR pourrait quant à elle jouer un rôle au cours du changement de conformation nécessaire au processus de fusion dans les endosomes (Krey *et al.*, 2010).

---

<sup>51</sup> *Intergenotypic Variable Region*

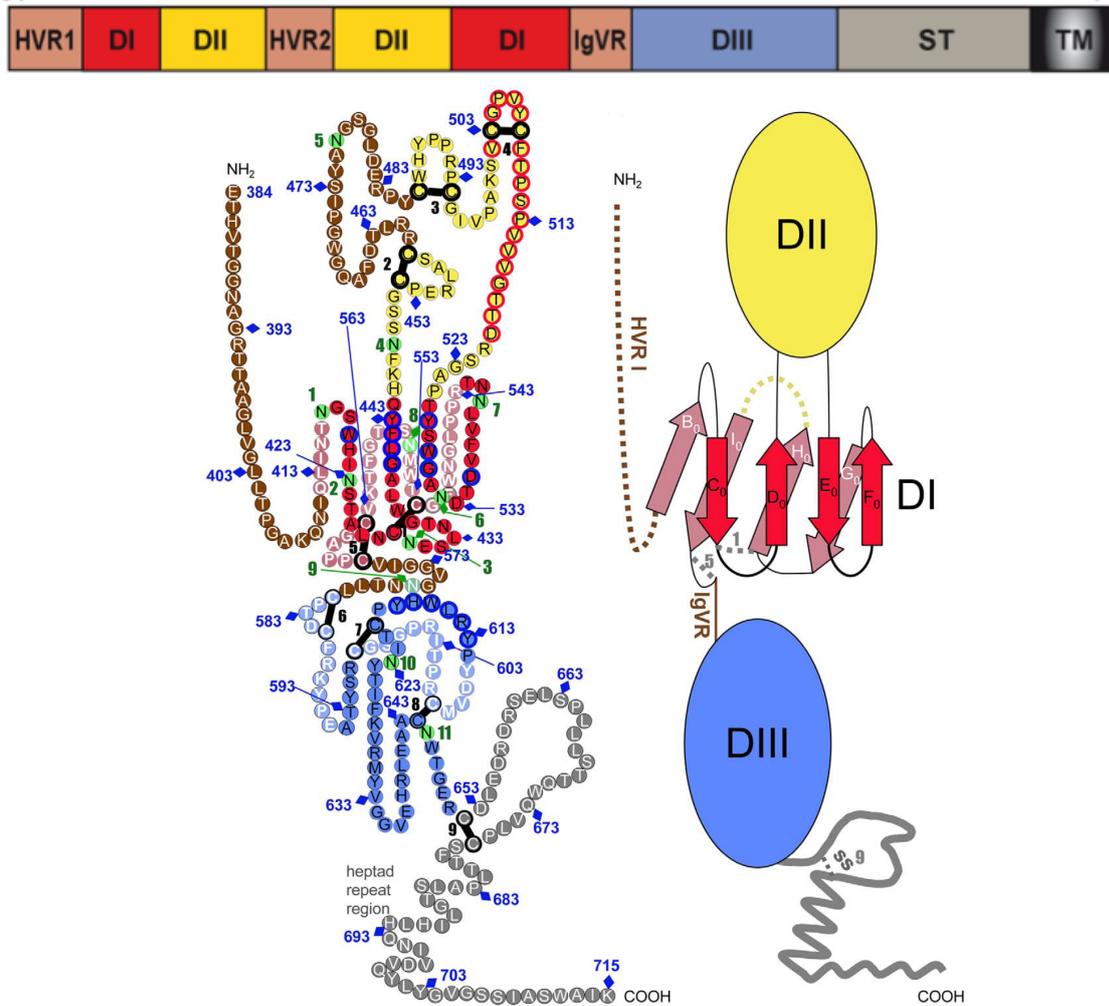


**Figure 14 :** Représentation schématique des glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 du VHC

E1 et E2 possèdent un TM en C-terminal. Les sites de glycosylation sont représentés par les petits symboles noirs au dessus des protéines. Plusieurs régions de E2 sont représentées : HVR1 (jouant un rôle dans l'interaction avec SRB1) ainsi que deux autres régions variables, HVR2 et IgVR. La région répétée est montrée en violet et les flèches noires indiquent les résidus importants pour l'interaction avec CD81.

Les structures exactes de E1 et E2 ne sont pas connues. Toutefois, une étude récente propose un modèle de la structure de E2 (Krey *et al.*, 2010). En effet, les auteurs ont généré une forme sE2 en cellules d'insectes qui semble refléter la conformation native de la protéine puisque cette sE2 est reconnue par des anticorps conformationnels ainsi que par CD81 et inhibe de façon efficace l'infection de cellules Huh-7.5 par les VHCcc. Cette sE2 a été utilisée afin d'identifier les neuf ponts disulfures présents dans E2. Cela, en association avec les études de prédiction passées, les données issues de délétions dans E2, la prise en compte des résidus impliqués dans l'interaction avec CD81 et l'analogie avec d'autres virus, a permis de proposer un modèle de la structure tertiaire de la glycoprotéine d'enveloppe. Ce modèle est présenté en **figure 15**. D'après ces travaux, l'ectodomaine est composé de trois domaines, nommés DI à DIII. Le DI contient la région HVR1 et huit feuilletts  $\beta$ . C'est au niveau de ce DI que sont localisées certains déterminants de l'interaction avec CD81 (Drummer *et al.*, 2006; Owsianka *et al.*, 2006). Le DII contient la deuxième région hypervariable (HVR2) et un potentiel domaine de fusion. Le DIII, au niveau duquel sont situés d'autres résidus importants dans l'interaction avec CD81 (Yagnik *et al.*, 2000), est séparé du DI par la troisième région IgVR. Enfin, en C-terminal de la protéine, on trouve une région flexible (ST<sup>52</sup>) qui relie l'ectodomaine à la partie transmembranaire.

<sup>52</sup> Stem



**Figure 15 : Modèle de la structure de l'ectodomaine de E2 (D'après Krey et al., 2010)**

*En haut* : vue linéaire de l'organisation de E2. *A droite* : modèle de la structuration des domaines de E2. *A gauche* : description précise des résidus de chaque domaine et leur rôle dans les fonctions de E2.

Ainsi, les régions variables (HVR1, HVR2 et IgVR) sont représentées en marron, D1 en rouge, D2 en jaune, D3 en bleu et enfin la région flexible (ST) et le TM en gris. Les résidus colorés en vert correspondent aux sites de glycosylation. Les résidus entourés de bleu jouent un rôle dans l'interaction avec CD81. Les résidus jaunes représentent le peptide de fusion potentiel. Les ponts disulfures sont colorés en noirs. La numérotation est basée sur les données de la souche H77.

Les hétérodimères E1E2 jouent donc un rôle important dans l'entrée virale via des interactions avec les récepteurs du VHC (Op de Beek *et al.*, 2004). Le rôle de E1 dans ce processus est moins bien connu que celui de E2, mais des anticorps dirigés contre E1 et E2 bloquent l'entrée du virus. Concernant E2, il a été montré qu'elle interagit avec CD81 (Cocquerel *et al.*, 2003a; Pileri *et al.*, 1998) et les résidus de E2 déterminants pour cette interaction ont été décrits (Flint *et al.*, 1999; Forns *et al.*, 2000; Patel *et al.*, 2000; Boo *et al.*, 2012; Callens *et al.*, 2005; Dhillon *et al.*, 2010; Drummer *et*

*al.*, 2006; Hsu *et al.*, 2003; Keck *et al.*, 2011; Owsianka *et al.*, 2001; 2006; 2008; Roccasecca *et al.*, 2003; Rothwangl *et al.*, 2008; Yagnik *et al.*, 2000) (**Figures 14 et 15**). Des études montrent aussi que E2 interagit avec SRB1, un autre facteur d'entrée du VHC. La région HVR1 de E2 semble jouer un rôle majeur dans cette interaction (Bartosch *et al.*, 2003a; Callens *et al.*, 2005; Scarselli *et al.*, 2002). En plus de leurs fonctions durant les premières étapes de l'entrée du VHC, un rôle des glycoprotéines d'enveloppe dans la fusion a aussi été rapporté (Ciczora *et al.*, 2007; Haid *et al.*, 2009; Lavillette *et al.*, 2006; 2007; Russell *et al.*, 2009). Les régions précises impliquées dans ce processus ne sont pas clairement définies. Certaines études proposent la présence d'un peptide de fusion dans la séquence de E1 (Drummer *et al.*, 2007; Russell *et al.*, 2009). D'autres travaux suggèrent que les déterminants de la fusion seraient présents dans E1 et E2 (Lavillette *et al.*, 2007). Dans le modèle structural de Krey et collaborateurs, un peptide de fusion candidat est situé au niveau du DII de E2, comme c'est le cas pour d'autres protéines de fusion de classe 2 de familles virales différentes mais présentant des caractéristiques communes. C'est par exemple le cas pour les protéines de fusion du SVF, appartenant au genre des *alphavirus* et à la famille des *Togaviridae*, et qui partage avec le VHC une organisation similaire de la partie structurale du génome (Krey *et al.*, 2010).

Comme déjà évoqué, les glycoprotéines d'enveloppe sont fortement N-glycosylées. E1 et E2 contiennent respectivement 4 à 5 et 9 à 11 sites de N-glycosylation. La grande conservation de ces sites parmi les différents génotypes du VHC témoigne de l'importance de leur rôle au cours du cycle viral. D'ailleurs, plusieurs études ont été menées afin de définir l'importance de ces glycanes dans la fonctionnalité du virus. Il a été montré que certains d'entre eux influencent la mise en conformation de E1 et E2, mais également l'entrée virale, la neutralisation par des anticorps et l'accessibilité de CD81 à son site de liaison sur E2 (Falkowska *et al.*, 2007; Goffard *et al.*, 2005; Helle *et al.*, 2007). Ces travaux ont été réalisés en utilisant le modèle des VHCpp, qui ne reflète pas de manière stricte l'état de glycosylation de E1 et E2 lorsque toutes les protéines virales sont exprimées. En effet, dans le contexte des VHCpp, et donc en l'absence des autres protéines du VHC, les particules virales sont assemblées dans un compartiment post-Golgi (Sandrin *et al.*, 2005). Par contre, il semble que l'assemblage des VHCcc ait lieu au niveau du RE. Cette dissemblance induit des différences notables entre les VHCpp et les VHCcc, notamment en terme d'interaction protéine-protéine mais également dans la maturation des glycanes (Vieyres *et al.*, 2010). C'est pourquoi plus récemment, Helle et

collaborateurs ont étudié le rôle des glycanes de E1 et E2 dans le système des VHCcc. Grâce à cette étude, ils ont pu confirmer leur importance durant le processus d'entrée, mais aussi leur attribuer d'autres rôles, au cours de l'assemblage et pour l'infectivité des particules virales notamment (Helle *et al.*, 2010). Une autre étude du laboratoire démontre l'importance de la glycosylation des glycoprotéines d'enveloppe au cours du cycle viral en utilisant les VHCcc. En 2007, Delgrange et collaborateurs ont en effet montré qu'une mutation d'adaptation consistant en l'abolition du sixième site de glycosylation de E2 (en position 532) augmente l'infectiosité du virus (Delgrange *et al.*, 2007).

La glycosylation de E1 et E2 joue donc un rôle majeur dans le cycle viral du VHC, ce qui en fait une bonne cible thérapeutique. Plusieurs études ont par exemple montré que les lectines, ligands spécifiques des glycanes présents à la surface des particules virales, peuvent inhiber l'infection par le VHC (Bertaux *et al.*, 2007; Helle *et al.*, 2006; Meuleman *et al.*, 2011). Helle et collaborateurs ont publié une telle stratégie qui s'est montrée efficace dans l'inhibition de l'infection par le VHC (Helle *et al.*, 2006). Ils ont montré qu'une lectine issue de procaryotes, la cyanovirin-N, empêche l'infection par les VHCpp et les VHCcc en bloquant l'interaction entre E2 et CD81. Plus récemment, une autre lectine a été testée et présente ce même effet d'inhibition de l'infection : la griffithsin (Meuleman *et al.*, 2011). Les auteurs sont toutefois allés un peu plus loin dans la caractérisation de ce nouvel inhibiteur, puisqu'en plus de l'avoir testé *in vitro* dans le contexte de cellules infectées par des VHCpp et des VHCcc, l'effet de la griffithsin a été évalué sur l'infection de souris au foie humanisé. Bien que de manière moins spectaculaire qu'*in vitro*, ils ont montré que la griffithsin inhibe l'infection *in vivo*. Cette étude montre également que cette lectine bloque la transmission de cellule à cellule du VHC, renforçant plus encore son potentiel thérapeutique. Cibler la glycosylation des glycoprotéines d'enveloppe se révèle donc efficace pour bloquer l'infection par le VHC. Cette stratégie est d'ailleurs également probante dans le cas de l'infection par d'autres virus, dont le VIH (Balzarini, 2007).

## 2. Les acteurs cellulaires

### a) Les molécules d'attachement

#### ❖ *Les lectines*

Les lectines L-SIGN<sup>53</sup> sont retrouvées à la surface des cellules endothéliales qui bordent les capillaires sinusoides du foie et les lectines DC-SIGN<sup>54</sup> à la surface des cellules dendritiques et de certains macrophages. Ce sont des lectines de type C qui sont par contre absentes de la surface des hépatocytes. D'ailleurs, il a été montré qu'elles ne permettent pas l'entrée des VHCpp et des VHCcc (Lai *et al.*, 2006), ne constituant donc pas des récepteurs spécifiques du VHC. Pourtant, des interactions directes avec les lectines L-SIGN et DC-SIGN ont été décrites pour des formes sE2, des VHCpp, ainsi que des particules virales issues de sera de patients infectés (Gardner *et al.*, 2003; Lozach *et al.*, 2004; Pohlmann *et al.*, 2003). Egalement, il est décrit qu'elles interagissent avec les structures glycaniques d'autres pathogènes (Koppel *et al.*, 2005). Récemment, ces lectines ont été impliquées dans la transmission du VHC de cellules non-permissives (en l'occurrence des cellules B) à des cellules permissives (des hépatocytes) (Stamataki *et al.*, 2009).

Les cellules exprimant les lectines L-SIGN et DC-SIGN sont retrouvées à proximité des hépatocytes. L'interaction entre ces lectines et les structures glycaniques portées par le virus servirait à concentrer les particules virales à proximité des hépatocytes et pourrait ainsi contribuer à l'établissement d'une infection persistante.

En 2003, une autre lectine de type C a été proposée en tant que récepteur du VHC : le récepteur aux asialoglycoprotéines (Saunier *et al.*, 2003). Cette étude présente en effet une interaction entre cette lectine, majoritairement présente à la surface des hépatocytes, et une forme sE2 produite en cellules d'insectes. Cependant, la confirmation de cette observation dans un autre système n'a jamais été montrée et semble nécessaire puisque la production en cellules d'insectes peut induire des différences dans le profil de glycosylation de E2 et donc biaiser la reconnaissance par les lectines.

---

<sup>53</sup> *Liver/lymph node-Specific ICAM-3 Grabbing Non-integrin*

<sup>54</sup> *Dendritic-Cell-Specific ICAM-3 Grabbing Non-integrin*

## ❖ Les GAGs

Les GAGs servent de molécules d'attachement ou de récepteurs d'entrée à de nombreux virus, dont des membres de la famille des *Flaviviridae* tels que les virus de la dengue et de la fièvre jaune (Chen *et al.*, 1997; Germi *et al.*, 2002b; Spillmann, 2001). Ils comprennent plusieurs molécules aux caractéristiques structurales variables. Parmi elles, l'héparane sulfate, présent à la surface des cellules hépatocytaires, a été montré comme impliqué pendant le processus d'entrée du VHC. En effet, plusieurs études décrivent que les héparanes sulfates et l'héparinase, une enzyme qui les dégrade, bloquent l'attachement du virus aux cellules (Barth *et al.*, 2006; Basu *et al.*, 2007; Germi *et al.*, 2002a; Koutsoudakis *et al.*, 2006). Il a également été montré que l'héparine, un homologue des héparanes sulfates, peut lier sE2 (Barth *et al.*, 2003; 2006). Afin de préciser le rôle joué par les GAGs dans l'entrée virale, des expériences de cinétiques à 4 et 37°C ont été réalisées et ont montré qu'ils interviennent lors de l'attachement du virus aux cellules, ne constituant pas des récepteurs d'entrée proprement dits du VHC (Koutsoudakis *et al.*, 2006; Zeisel *et al.*, 2007). Récemment, une interaction entre l'héparine et les glycoprotéines d'enveloppe de particules virales infectieuses extra et intracellulaires a été décrite (Vieyres *et al.*, 2010). Toutefois, les domaines précis des glycoprotéines d'enveloppe impliqués dans cette interaction ne sont pas connus. Il a été suggéré que la région HVR1 de E2 pourrait jouer ce rôle (Penin *et al.*, 2001). Dans ce sens, un peptide synthétique correspondant à la séquence de HVR1 présente une forte affinité pour l'héparine et des anticorps dirigés contre le domaine HVR1 de E2 peuvent inhiber l'interaction entre E2 et l'héparine (Barth *et al.*, 2006; Basu *et al.*, 2007). Aussi, l'ApoE est connue pour être un ligand des GAGs. Connaissant la composition des LVP et sachant qu'ApoE est associée aux particules virales (Chang *et al.*, 2007), on ne peut pas exclure que l'interaction entre le virus et les héparanes sulfates soit médiée par ApoE. C'est d'ailleurs ce que montre une étude récente (Jiang *et al.*, 2012). Entre autre, des expériences de liaison à l'héparine ont été réalisées *in vitro*. De manière intéressante, des mutants de ApoE n'interagissant plus avec l'héparine ne permettent pas de restaurer l'infection par des VHCcc dans des cellules Huh-7.5 qui, après ARN interférence, n'expriment plus de ApoE endogène. Cela suggère que ApoE est le médiateur de l'attachement des LVP à la cellule.

## ❖ Le LDL-R

Comme déjà évoqué, le VHC circule sous forme de LVP dans le sang des patients infectés (Andre *et al.*, 2002). Ainsi, par l'intermédiaire de sa partie lipoprotéique, le VHC pourrait utiliser le LDL-R pour se fixer aux cellules. En effet, le LDL-R est exprimé à la surface des hépatocytes et interagit avec les ApoB et ApoE à la surface des lipoprotéines afin de réguler le métabolisme des lipides. C'est en 1999 que le LDL-R a pour la première fois été montré comme impliqué dans l'infection par le VHC (Agnello *et al.*, 1999). Depuis, de nombreuses études ont confirmé son rôle dans l'attachement des particules virales aux cellules (Germi *et al.*, 2002a; Martin *et al.*, 2008; Molina *et al.*, 2007; Owen *et al.*, 2009). En effet, des anticorps anti-LDL, anti-VLDL, anti-LDL-R, anti-ApoB et anti-ApoE bloquent l'entrée du VHC. Récemment, des expériences d'ARN interférence ont montré que la diminution de l'expression du LDL-R inhibe l'entrée de VHCcc dans les cellules (Albecka *et al.*, 2012; Owen *et al.*, 2009). Enfin, Molina et collaborateurs ont publié en 2007 qu'il existe une corrélation entre l'accumulation d'ARN viral dans les cellules, l'expression du LDL-R et l'entrée des LDL (Molina *et al.*, 2007). Le rôle exact du LDL-R dans le cycle viral reste néanmoins controversé. En 2007, Andreo et collaborateurs ont étudié l'effet de la lipoprotéine lipase sur l'infection par le VHC. Cette enzyme hydrolyse les triglycérides des VLDL et génère des lipoprotéines de densité intermédiaire. Leurs résultats montrent qu'en présence de cette enzyme, l'attachement du virus aux cellules est favorisé, alors que l'infection par le VHC est inhibée (Andréo *et al.*, 2007). En corrélation avec ces résultats, une étude récente suggère également que l'entrée médiée par le LDL-R conduirait à une voie non-productive (Albecka *et al.*, 2012) (**Figure 13**). Ce travail propose également un rôle du LDL-R dans l'étape de réplication du virus. Dans ce sens, une étude très récente a montré que l'inhibition de l'expression du LDL-R (par ARN interférence) n'affecte pas l'attachement des VHCcc à la surface des cellules mais a un effet inhibiteur important sur l'infection, suggérant que cette molécule serait nécessaire à une étape du cycle viral autre que celle de l'attachement (Jiang *et al.*, 2012).

## b) Les récepteurs d'entrée du VHC

### ❖ *La tétraspanine CD81*

- **La structure de CD81:** CD81 est une protéine de 26 kDa appartenant à la famille des tétraspanines. En tant que telle, CD81 est composée de : quatre TM, une petite (la SEL<sup>55</sup>) et une grande boucle extracellulaire (la LEL<sup>56</sup>), ainsi que trois courtes régions cytoplasmiques (Charrin *et al.*, 2009b; Levy & Shoham, 2005b) (**Figure 16 A**). Dans la LEL se trouve un motif conservé de trois résidus (CCG) engagé dans la formation de ponts disulfures importants pour la structuration de la LEL. Les tétraspanines peuvent être modifiées post-traductionnellement, soit par glycosylation ou soit par palmitoylation (Levy & Shoham, 2005b). Contrairement à d'autres membres de cette famille, CD81 n'est pas glycosylée. Elle est par contre palmitoylée. CD81 possède en effet huit cystéines juxtamembranaires palmitoylables. Une étude a montré que la mutation d'au moins six de ces résidus est nécessaire à la dépalmitoylation de CD81, indiquant ainsi que plusieurs cystéines juxtamembranaires sont modifiées (Delandre *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2012) (**Figure 16A**).

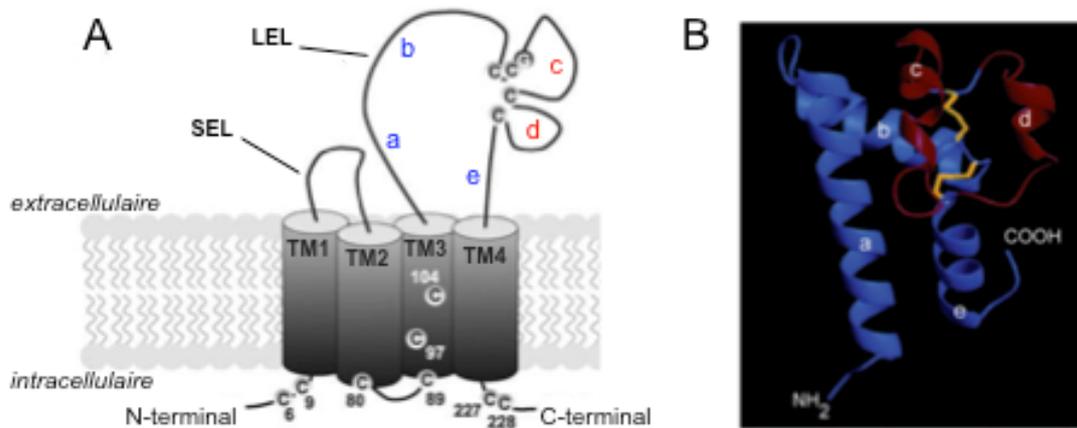
Une structure de la LEL de CD81 a été publiée en 2001 (Kitadokoro *et al.*, 2001). Les auteurs ont obtenu un dimère de LEL de CD81 cristallisé, au sein duquel chaque LEL est composée de cinq hélices  $\alpha$ , notées a, b, c, d et e (**Figure 16B**). Dans ce modèle, deux hélices antiparallèles (a et e) en continuité avec les TM3 et 4 forment le « pied » de la LEL, alors que les hélices b, c et d constituent sa « tête ». La « tête » est stabilisée par la présence de ponts disulfures, qui sont au nombre de deux dans CD81. La spécificité de chaque tétraspanine réside plutôt au niveau des hélices c et d, qui présentent la plus grande variabilité de séquence (Seigneuret, 2001; Stipp *et al.*, 2003b). Cette année, une deuxième étude s'est attachée à étudier la structure de la LEL de CD81, sous forme de monomère en solution et par RMN cette fois (Rajesh *et al.*, 2012). Dans ce travail, les auteurs proposent que l'hélice d soit un domaine très dynamique. Sa dynamique structurale permettrait notamment à CD81 de lier efficacement E2 au niveau des différentes régions de la glycoprotéine impliquées dans l'interaction. La flexibilité de

---

<sup>55</sup> *Small Extracellular Loop*

<sup>56</sup> *Large Extracellular Loop*

l'hélice d pourrait en effet permettre à la LEL de se mouler contre E2 de façon à obtenir la meilleure affinité possible.



**Figure 16 : La tétraspanine CD81**

**A)** Représentation schématique de CD81 (d'après Delandre *et al.*, 2009). CD81 possède quatre TM (TM1 à 4), une petite boucle extracellulaire (SEL) et une grande (LEL), et des queues cytoplasmiques N- et C-terminales présentant des cystéines juxtamembranaires conservées. La LEL, formée par cinq hélices  $\alpha$  (a à e) (d'après Kitadokoro *et al.*, 2001) contient un motif CCG conservé qui forme deux ponts disulfures avec d'autres cystéines localisées dans la LEL. C cystéine ; G = glycine. **B)** Structure des hélices  $\alpha$  de la LEL. a et e forment un « pied » coiffé par b, c et d, trois hélices qui forment la « tête » de la LEL. Le domaine variable (hélices c et d) est représenté en rouge (d'après Seigneuret *et al.*, 2001).

**- L'identification de CD81 en tant que facteur d'entrée du VHC:** CD81 a pour la première fois été proposée comme l'un des récepteurs d'entrée du VHC en 1998 (Pileri *et al.*, 1998). Pour cela, les auteurs ont utilisé une banque d'ADNc générée à partir d'une lignée capable de lier une forme sE2, en l'occurrence une lignée de cellules T appelée Molt-4. Après l'identification de CD81 en tant que molécule médiant l'interaction entre sE2 et les cellules, les auteurs ont montré que cette interaction est spécifiquement inhibée par des anticorps anti-CD81, mais également qu'une forme soluble de la LEL de CD81 (sLEL) peut lier sE2. Des expériences de neutralisation de l'interaction par du sérum de chimpanzés vaccinés avec la sE2 ont montré que les anticorps produits *in vivo* chez l'animal pouvaient bloquer l'interaction entre sE2 et CD81. Plus tard, en utilisant la sE2 ou les VHCpp, il a été confirmé que cette interaction est spécifique de CD81 en testant la liaison de E2 à d'autres tétraspanines, notamment CD9, CD63 et CD151 (Flint *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2004).

Le rôle de CD81 en tant que récepteur du VHC a été confirmé ensuite dans les systèmes des VHCpp et VHCcc. Ainsi, il a été montré que l'entrée du virus est inhibée en présence d'anticorps anti-CD81 ou de sLEL (Bartosch *et al.*, 2003c; Cormier *et al.*, 2004; Hsu *et al.*, 2003; Lavillette *et al.*, 2005b; Lindenbach *et al.*, 2005; Wakita *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2004; Zhong *et al.*, 2005). Aussi, dans des expériences d'ARN interférence de CD81, l'étape d'entrée est également inhibée, en utilisant les VHCpp, VHCcc ou des particules issues de sera de patients infectés (Jiang *et al.*, 2012; Koutsoudakis *et al.*, 2007; Molina *et al.*, 2008; Zeisel *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2004)). Plus récemment, dans un modèle de souris au foie humanisé, Meuleman et collaborateurs ont montré que des anticorps anti-CD81 peuvent protéger de l'infection *in vivo* (Meuleman *et al.*, 2008).

Il semble que l'affinité de sE2 pour CD81 dépende du génotype dont est issu E2 (Roccasecca *et al.*, 2003; Shaw *et al.*, 2003). Cependant, plusieurs études rapportant des expériences en système VHCpp et VHCcc ont montré que CD81 est nécessaire à l'infection par tous les génotypes du VHC testés (Gottwein *et al.*, 2009; Lavillette *et al.*, 2005b; McKeating *et al.*, 2004). Comme déjà abordé, la mise en conformation de E2 nécessite la présence de E1 (Brazzoli *et al.*, 2005; Cocquerel *et al.*, 2001). Aussi, E2 exprimé seule n'est pas reconnue par un anticorps conformationnel et n'interagit que faiblement avec CD81 (Cocquerel *et al.*, 2003a, b). Cela pourrait expliquer pourquoi les résultats en biochimie ne reflètent pas parfaitement l'interaction réelle entre CD81 et E2.

**- Les régions de E2 et CD81 impliquées dans l'interaction :** les régions de E2 importantes pour l'interaction ont été identifiées (**Figure 15**). Plus précisément, les résidus impliqués sont situés dans deux régions du domaine DI de E2 (Drummer *et al.*, 2006; Owsianka *et al.*, 2006). Une troisième région a été suggérée et se situe au sein du DIII de E2 (Yagnik *et al.*, 2000). D'ailleurs, des substitutions d'alanines dans cette région affectent l'attachement de E2 à CD81 (Iacob *et al.*, 2008). Il est intéressant de noter que, dans le modèle de l'ectodomaine de E2 de Krey et collaborateurs, ces trois régions impliquées dans l'interaction avec CD81 se retrouvent proches les unes des autres (Krey *et al.*, 2010). Il a également été rapporté un rôle des régions variables de E2. Notamment, en association avec HVR2, la région HVR1 pourrait moduler l'interaction entre E2 et CD81 (Roccasecca *et al.*, 2003).

Réciproquement, des études ont été menées afin d'identifier les résidus de CD81 importants pour l'interaction avec E2. Dès 1998 et l'identification de CD81 en tant que récepteur du VHC, la LEL avait été identifiée comme le domaine responsable de l'interaction avec E2 (Pileri *et al.*, 1998). Plus tard, cette observation sera confirmée dans plusieurs études, notamment grâce à l'utilisation de chimères CD81/CD9 puisque la LEL de CD81 dans le contexte du CD9 suffit à rendre permissive la lignée HepG2, une lignée d'origine hépatique dépourvue de CD81 et naturellement résistante à l'infection par le VHC (Zhang *et al.*, 2004). Des études ont également montré que les deux ponts disulfures de la LEL de CD81 sont nécessaires à la reconnaissance de E2 (Drummer *et al.*, 2002; Petracca *et al.*, 2000). Il est aussi rapporté que les formes dimériques de CD81 sont plus efficaces dans l'interaction avec E2 que les formes monomériques (Drummer *et al.*, 2002; 2005; Nakajima *et al.*, 2005). De manière plus précise, les acides aminés impliqués dans la liaison de CD81 à E2 ont été étudiés. L'importance du résidu 186 a été proposée en 2000 (Higginbottom *et al.*, 2000). Alors que la LEL de CD81 humain interagit avec sE2, ce n'est pas le cas pour la LEL de CD81 issu du singe vert d'Afrique. Par comparaison de séquences puis mutagenèse, les auteurs ont montré que le remplacement de ce résidu dans la séquence de la LEL humaine abolit l'interaction LEL-sE2. Il a été confirmé plus tard que cet acide aminé est important, tout comme trois autres résidus également situés au niveau des boucles c et d (acides aminés 162, 182, 284) de la LEL de CD81 (Drummer *et al.*, 2002). De manière intéressante, dans des expériences de compétitions avec de petits peptides mimant l'hélice d de la LEL de CD81, l'interaction entre CD81 et sE2 a pu être inhibée (VanCompernelle *et al.*, 2003). De la même façon que pour les formes sE2 par rapport au contexte naturel, des travaux rapportent que l'utilisation de la LEL de CD81 ne reflète pas forcément le comportement de la protéine entière dans les études de liaison à E2 (Bertaux & Dragic, 2006; Drummer *et al.*, 2005; Flint *et al.*, 2006). Ainsi, certaines mutations influençant l'interaction entre CD81 et la sE2 révèlent n'avoir que peu ou pas de conséquence lors de l'infection par les VHCpp. C'est le cas pour la mutation des résidus 182, 184 et 186 de la LEL par exemple. Concernant CD81, un exemple pouvant illustrer les différences observées quant à l'utilisation de LEL recombinante ou de protéine entière est celui du CD81 de souris. En effet, la LEL du CD81 murin n'inhibe pas l'infection par les VHCpp alors que la protéine CD81 entière d'origine murine est capable de partiellement restaurer l'infection par les VHCpp dans des cellules hépatiques (Flint *et al.*, 2006; Rocha-Perugini *et al.*, 2009).

Outre la LEL, des études suggèrent l'importance d'autres domaines de CD81 dans l'infection par le VHC, comme par exemple la région C-terminale, certaines cystéines palmitoylées, la SEL ou encore les TM3 et 4 (Bertaux & Dragic, 2006; Masciopinto *et al.*, 2001; Montpellier *et al.*, 2011). Toutefois, la LEL semble le déterminant majeur de l'infection puisqu'une chimère constituée de la LEL de CD81 humaine dans le contexte de la protéine CD9, naturellement incapable de médier l'infection par le VHC, confère la susceptibilité aux VHCpp à des cellules HepG2 (Zhang *et al.*, 2004).

**- L'importance du niveau d'expression de CD81 :** il semble que le niveau d'expression de CD81 soit déterminant dans la susceptibilité des lignées cellulaires à l'infection par le VHC. Par exemple, les lignées hépatiques HepG2 et HH29 n'expriment pas CD81 et sont résistantes à l'infection par le virus. De manière intéressante, il a été montré que cette résistance à l'infection est directement corrélée à l'absence de CD81 puisque l'expression ectopique de cette tétraspanine suffit à rendre ces deux lignées susceptibles à l'infection par les VHCpp et VHCcc ((Bartosch *et al.*, 2003a; Cormier *et al.*, 2004; Hsu *et al.*, 2003; Lavillette *et al.*, 2005b; Lindenbach *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2004)). En 2007, deux études ont également corréler la résistance aux VHCpp et VHCcc de sous clones de cellules Huh-7 à la faible, voire indetectable, expression de CD81 ((Akazawa *et al.*, 2007; Koutsoudakis *et al.*, 2007)). Parmi ces clones cellulaires, les Huh-7-Lunet ont par exemple été rendues permissives à l'infection via l'expression ectopique de CD81 ((Koutsoudakis *et al.*, 2007)). Dans cette étude, il est même suggéré qu'un seuil minimal d'expression de CD81 soit nécessaire à l'entrée du VHC. Ce seuil a ainsi été estimé à  $7.10^4$  molécules/cellule. Plus récemment, une lignée cellulaire dépourvue de CD81 a été générée sur la base de sa résistance à l'infection : la lignée Huh-7w7 ((Rocha-Perugini *et al.*, 2009)). Cette lignée confirme l'importance du niveau d'expression de CD81 pour l'infection et s'avère très utile dans les études de complémentation par des protéines CD81 d'autres espèces, chimériques ou mutées ((Montpellier *et al.*, 2011; Rocha-Perugini *et al.*, 2009)).

**- La place de CD81 dans la cinétique d'entrée virale :** au cours du cycle viral, CD81 semble intervenir après l'attachement des particules virales à la surface cellulaire. En effet, des expériences de cinétique consistant en l'incubation du virus à 4°C, afin de permettre la liaison du virus à la surface de la cellule, suivie d'un transfert à 37°C, qui

permet l'entrée du virus, ont largement été réalisées. Ces études ont permis de montrer que des anticorps anti-CD81 sont capables de bloquer l'entrée des VHCpp et VHCcc lorsqu'ils sont ajoutés après le transfert à 37°C (Cormier *et al.*, 2004; Evans *et al.*, 2007; Koutsoudakis *et al.*, 2006; Zeisel *et al.*, 2007). D'ailleurs, même ajoutés jusqu'à 1h après le transfert à 37°C, les anticorps dirigés contre CD81 inhibent toujours 50% de l'infection par des VHCcc (Koutsoudakis *et al.*, 2006), ce qui suggère que 50% des particules virales sont entrées après 1h d'incubation à 37°C. Les  $t_{1/2}$  de l'effet inhibiteur des anticorps sur l'entrée des VHCpp et VHCcc ont également été calculés et sont respectivement de 17 et 18 min (Bertaux & Dragic, 2006; Evans *et al.*, 2007). Récemment, ces données ont été confirmées dans des expériences d'ARN interférence. En effet, selon l'étude de Jiang et collaborateurs, l'absence d'expression de CD81 en surface ne bloque pas l'attachement des VHCcc aux cellules (Jiang *et al.*, 2012).

**- Le rôle joué par CD81 au cours de l'entrée virale :** CD81 est donc clairement impliquée au cours du cycle viral. Elle interagit avec E2 et joue un rôle après l'étape d'attachement du virus à la cellule. Bien qu'une équipe ait récemment publié un rôle additionnel de CD81 dans la réplication du VHC (Zhang *et al.*, 2010), cette tétraspanine reste très majoritairement décrite pour son importance lors de l'étape d'entrée du virus. Cependant, le rôle précis joué par cette tétraspanine doit encore être élucidé.

En 2008, une étude a rapporté un rôle de CD81 dans l'activation de voies de signalisation cellulaire (Brazzoli *et al.*, 2008). Les auteurs ont étudié l'effet de l'engagement de CD81, par des anticorps anti-CD81 et des formes recombinantes E2 ou E1E2, dans l'activation des membres de la famille des Rho GTPases, ainsi que de la voie MAPK<sup>57</sup>. Ainsi, ils ont pu conclure que l'engagement de CD81 par le virus induit des réarrangements de l'actine via l'activation des Rho GTPases. Ces réarrangements d'actine semblent nécessaires à la migration du complexe E2-récepteur jusqu'aux jonctions serrées des cellules infectées et essentiels à l'entrée du virus. Dans cette étude, il est également montré que l'engagement de CD81 déclenche l'activation de la voie MAPK, qui semble nécessaire à des événements plus tardifs du cycle viral. Ainsi, à la manière de nombreux autres virus, il semble que via CD81, le VHC utilise les voies de signalisation de la cellule hôte à l'avantage de son cycle viral.

---

<sup>57</sup> *Mitogen-Activated Protein Kinase*

Il a été rapporté récemment que CD81 pourrait préparer les particules virales en vue du processus de fusion. Comme déjà évoqué, la fusion des membranes cellulaires et virales dans les endosomes nécessite une acidification du pH. Pourtant, les particules virales libres ne sont pas sensibles au traitement par pH acide, ce qui suggère qu'au cours du processus d'entrée, un ou plusieurs récepteurs préparent la particule virale à devenir sensible au pH acide afin que le changement de conformation des glycoprotéines d'enveloppe nécessaire à la fusion ait lieu. Sharma et collaborateurs ont montré que la LEL de CD81 est responsable de cela (Sharma *et al.*, 2011). En effet, le pré-traitement du virus avec de la LEL de CD81 entraîne un changement de conformation de E1 et E2 à la surface du virus et augmente l'infectivité, suggérant que CD81 confère au virus sa susceptibilité au pH acide des endosomes.

Le rôle de CD81 dans l'entrée du VHC semble également lié à sa capacité à interagir avec CLDN-1, une autre protéine nécessaire à l'entrée du VHC dans les cellules (Harris *et al.*, 2008; Mee *et al.*, 2009). D'ailleurs, des mutations au sein de CLDN-1 qui abolissent son interaction avec CD81 rendent également ce co-récepteur résistant à l'entrée du virus. A l'inverse, des mutations qui rendent CLDN-7 capable d'interagir avec CD81 permettent l'entrée des VHCpp, alors que la protéine CLDN-7 n'est pas active naturellement en tant que récepteur du virus (Harris *et al.*, 2010). Aussi, des expériences de FRET<sup>58</sup> réalisées en parallèle d'infections par des VHCcc ont montré que les anticorps anti-CLDN-1 capables de bloquer l'entrée du VHC empêchent l'interaction entre CLDN-1 et CD81 (Krieger *et al.*, 2010). La formation du complexe CD81-CLDN-1 semble donc cruciale à l'établissement d'un processus d'entrée efficace.

Il a été rapporté que le VHC utilise deux voies d'entrée dans les cellules. Une voie via les particules virales sécrétées dans le milieu extracellulaire et la voie dite de transmission cellule à cellule (Timpe *et al.*, 2008). L'implication de CD81 dans cette voie de transmission du virus est controversée. En effet, certaines études montrent que le passage du VHC de cellule à cellule est CD81-indépendant (Jones *et al.*, 2010; Timpe *et al.*, 2008; Witteveldt *et al.*, 2009), alors que d'autres travaux concluent que CD81 est un récepteur nécessaire au deux voies d'entrée (Brimacombe *et al.*, 2011; Russel *et al.*, 2008). Des expériences complémentaires seront nécessaires afin de définitivement distinguer entre ces deux résultats.

---

<sup>58</sup> Fluorescence Resonance Energy Transfert

**- CD81 et la spécificité d'espèce :** CD81 ne semble pas être le seul facteur déterminant la restriction d'espèce liée à l'infection par le VHC. En effet, les protéines CD81 issues de diverses espèces permettent de restaurer l'infectivité de cellules HepG2, même si certaines avaient été montrées comme n'interagissant pas avec la sE2 (Flint *et al.*, 2006). Ainsi, l'infection par le VHC peut, entre autres, être médiée par des CD81 provenant du chimpanzé, du tamarin, du singe vert d'Afrique ou encore de la souris (Flint *et al.*, 2006; Rocha-Perugini *et al.*, 2009). Récemment, un article a rapporté que le CD81 de toupaye peut aussi servir de récepteur au VHC (Tong *et al.*, 2011). En effet, des cellules HepG2 exprimant CD81 issue de toupaye sont infectables par les VHCpp, tout comme les hépatocytes primaires provenant de cet animal. D'autres évidences sur le fait que CD81 ne suffit pas à définir la spécificité d'espèce ont été publiées. Ainsi, la CD81 d'origine humaine (hCD81) ne permet pas de rendre infectables des souris transgéniques (Masciopinto *et al.*, 2002). Aussi, les VHCpp n'infectent pas les cellules CHO<sup>59</sup> ni des cellules murines, telles que les NIH-3T3, exprimant la hCD81 (Bartosch *et al.*, 2003a, c; Cormier *et al.*, 2004; Evans *et al.*, 2007; Lavillette *et al.*, 2005b). En 2009, une étude a montré que les protéines CD81 et OCLN seraient responsables de la spécificité d'espèce lors de l'infection par le VHC, puisque qu'elles devaient nécessairement être d'origine humaine pour médier l'infection (Ploss *et al.*, 2009).

Afin de contourner la spécificité liée à l'espèce lors de l'infection par le VHC, une équipe a récemment adapté le virus au CD81 murin (mCD81) (Bitzegeio *et al.*, 2010). Trois mutations dans la séquence des glycoprotéines d'enveloppe ont ainsi permis aux auteurs de générer des particules virales capables d'infecter des cellules NIH-3T3 n'exprimant aucun facteur d'entrée d'origine humaine.

### ❖ *Le récepteur SRB1*

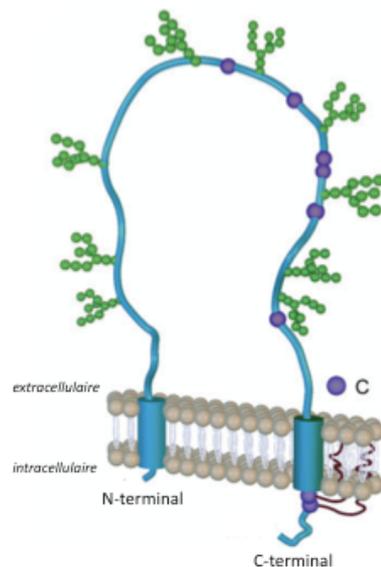
SRB1 est une protéine membranaire hautement glycosylée, exprimée au niveau du foie et des tissus stéroïdogéniques. Elle se compose de deux courtes queues cytoplasmiques, deux TM et une large boucle extracellulaire (Rhains & Brissette, 2004) (**Figure 17**).

Le récepteur SRB1 est largement impliqué dans le métabolisme lipidique puisqu'il est responsable du transfert bidirectionnel des lipides. Ses ligands

---

<sup>59</sup> *Chinese Hamster Ovary*

physiologiques sont notamment les HDL, LDL, VLDL mais également des apolipoprotéines telles que ApoE et ApoB. SRB1 a la particularité d'extraire sélectivement le cholestérol contenu par ses substrats sans recourir à l'internalisation des lipoprotéines entières. De plus, le transport est bidirectionnel car SRB1 médie également la sortie du cholestérol de la cellule vers les lipoprotéines ou d'autres tissus (Rhains & Brissette, 2004).



**Figure 17 : Structure du récepteur SRB1**  
(d'après Cocquerel *et al.*, 2006)

Le récepteur SRB1 est composé de deux TM, deux queues cytoplasmiques et une grande boucle extracellulaire. Cette boucle extracellulaire contient neuf sites potentiels de N-glycosylation (en vert) et six cystéines (en violet). SRB1 est palmitoylé au niveau de deux cystéines juxtamembranaires de l'extrémité C-terminale.

SRB1 est la deuxième molécule, après CD81, à avoir été identifiée comme récepteur potentiel du VHC. En effet, c'est en 2002 que Scarselli et collaborateurs ont rapporté son interaction avec la sE2, dépendamment de la région HVR1 de la glycoprotéine d'enveloppe (Scarselli *et al.*, 2002). Une étude plus récente a montré qu'une région constituée des acides aminés 70 à 87 ainsi qu'un résidu en position 210 sont responsables de cette interaction (Catanese *et al.*, 2010). Le rôle joué par ce récepteur dans l'entrée du virus a pu ensuite être confirmé grâce aux VHCpp et VHCcc. Des anticorps anti-SRB1 ainsi que l'inhibition de son expression par ARN interférence bloquent l'entrée des particules virales pseudotypées ou produites en culture cellulaire (Bartosch *et al.*, 2003a; Catanese *et al.*, 2007; 2010; Dreux *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2012; Kapadia *et al.*, 2007; Lavillette *et al.*, 2005b; Zeisel *et al.*, 2007). Ainsi, il a été montré que

l'interaction entre SRB1 et les VHCpp ou du virus issu de patients infectés peut être bloquée par des anticorps anti-E2 (Grove *et al.*, 2007). Ce résultat reste cependant controversé puisque d'autres expériences, utilisant du virus provenant de sera de patients infectés et des cellules CHO exprimant SRB1, rapportent que ni des anticorps anti-E2 ou anti-E1 ni des anticorps anti-HVR1 n'ont la capacité de bloquer la liaison SRB1-virus, alors que des lipoprotéines (particulièrement des VLDL) peuvent empêcher cette interaction. Cela suggère que l'interaction avec SRB1 aurait plutôt lieu grâce à la partie lipoprotéique des LVP (Maillard *et al.*, 2006). Outre des expériences d'inhibition, la surexpression a également permis de montrer l'importance de SRB1 dans l'entrée du VHC (Grove *et al.*, 2007). En effet, la surexpression de SRB1 et de SRB2, une isoforme de SRB1, permet d'augmenter l'infection par des VHCcc.

Des expériences de cinétiques ont montré que SRB1 intervient après l'étape d'attachement du virus, probablement en coopération avec CD81 (Zeisel *et al.*, 2007). En effet, des cinétiques d'inhibition par des anticorps anti-CD81 et anti-SRB1 présentent des résultats très proches, indiquant un rôle presque simultané des deux co-récepteurs. Cependant, il a été montré que les VHCcc sont capables de s'attacher à des cellules CHO exprimant SRB1 mais pas à des cellules exprimant CD81, ce qui suggère que les particules virales rencontrent d'abord SRB1 puis CD81 lors de l'entrée virale (Evans *et al.*, 2007).

Certains ligands naturels de SRB1 influencent l'entrée virale. C'est tout d'abord le cas des HDL qui favorisent l'entrée des VHCpp et VHCcc, et ce en lien avec une augmentation de l'activité de transfert lipidique du récepteur. Aussi, les HDL peuvent avoir un rôle de protection contre les anticorps neutralisants (Bartosch *et al.*, 2005; Dreux *et al.*, 2006; Voisset *et al.*, 2005; 2006). Les LDL oxydées (LDLox), LDL modifiées après un stress oxydatif par exemple, sont également un ligand naturel du VHC. Mais, à l'inverse des HDL, les LDLox diminuent l'infection par les VHCpp et VHCcc (Hahn *et al.*, 2006). De la même façon, l'infection peut être inhibée par l'apolipoprotéine sérum amyloïde A (SAA) (Cai *et al.*, 2007; Lavie *et al.*, 2006). La SAA est produite dans le foie à la suite de dommages tissulaires ou d'une inflammation (Uhlar & Whitehead, 1999) et pourrait ainsi contribuer à la protection de l'hôte.

Il semble donc que SRB1 intervienne de deux manières au cours du processus d'entrée virale : 1) en interagissant avec les LVP à la surface des cellules, 2) via son activité de transfert lipidique qui influence cette étape (Dreux *et al.*, 2009). En accord

avec cette observation, il a été montré que les régions de SRB1 impliquées dans l'interaction avec la particule virale sont différentes de celles engagées lors de la liaison à ses ligands physiologiques (Catanese *et al.*, 2010). En effet, il a été montré que des mutants de SRB1 qui n'interagissent plus avec sE2 et ne sont plus capables de restaurer l'infection, gardent toutefois la capacité à fixer les HDL. Dans ce sens également, l'étude de von Hahn rapporte que les LDLox inhibent l'entrée du virus sans affecter la capacité de SRB1 à lier sE2 (Hahn *et al.*, 2006). Aussi, une étude très récente a démontré que SRB1 joue de multiples fonctions dans l'entrée du VHC : une fonction d'attachement dépendante des lipoprotéines associées au virus qui permet de le capturer à la surface, une fonction d'accès qui médie l'entrée des particules virales et enfin une fonction facilitatrice de l'entrée qui est la seule qui soit dépendante de l'interaction avec E2 (Dao Thi *et al.*, 2012). D'ailleurs, une autre étude récente a rapporté un rôle de SRB1 après l'attachement du virus à la surface cellulaire (Zahid *et al.*, 2012). Les auteurs ont montré que cette fonction est indépendante de la liaison à E2 et serait plutôt liée à l'activité de transfert lipidique de SRB1.

Enfin, plusieurs études révèlent que SRB1 joue un rôle important au cours de la transmission de cellule à cellule du VHC (Brimacombe *et al.*, 2011; Meuleman *et al.*, 2012). Dans l'une de ces études, un anticorps monoclonal dirigé contre SRB1 a été généré et, en plus de bloquer les deux voies d'entrée du virus, il est capable de protéger *in vivo* des souris au foie humanisé (Meuleman *et al.*, 2012). Egalement, l'étude de Zahid et collaborateurs suggère que le rôle de SRB1 au cours de la transmission de cellule à cellule serait moins lié à sa capacité à lier E2 qu'à ses fonctions post-attachement (Zahid *et al.*, 2012). Ces résultats témoignent donc de l'importance du rôle joué par ce récepteur au cours de l'entrée virale mais encourage également à considérer l'intérêt de cibler SRB1 pour de futures stratégies thérapeutiques.

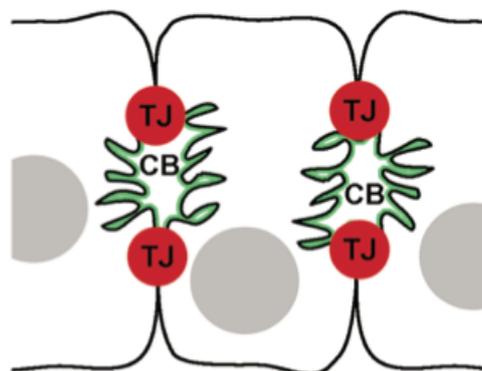
### ❖ Les claudines

Les claudines sont des protéines transmembranaires constitutives des jonctions serrées (TJ<sup>60</sup>) (Tsukita *et al.*, 2001). Les TJ sont des structures particulières formées par les membranes de deux cellules adjacentes (**Figure 18**). Elles constituent des barrières paracellulaires responsables de l'étanchéité des épithéliums, en permettant le passage

---

<sup>60</sup> Tight Junctions

sélectif des solutés d'un compartiment à l'autre. Egalement, les TJ limitent la diffusion des lipides et des protéines membranaires et sont donc importantes dans le maintien de la polarisation cellulaire. Au sein de ces structures, les protéines claudines interagissent avec d'autres protéines membranaires telles que les occludines, mais également avec des protéines intracellulaires qui font notamment le lien entre les TJ et le cytosquelette. Ces structures sont importantes dans les mécanismes de protection de l'hôte contre les pathogènes, puisqu'elles forment une barrière entre l'extérieur et l'intérieur des organes. Ce sont aussi des sites privilégiés de certains processus cellulaires tels que l'endocytose ou la signalisation intracellulaire (Benedicto *et al.*, 2012). Plusieurs études rapportent que certains pathogènes utilisent ou remanient ces TJ à leur avantage afin d'infecter les cellules hôtes. C'est par exemple le cas du virus coxsackie B (CVB) ou de certains adénovirus qui utilisent CAR<sup>61</sup>, une protéine associée aux TJ, en tant que récepteur (Gonzalez-Mariscal *et al.*, 2009). Aussi, il a été montré que les rotavirus pénètrent les cellules via une altération de l'étanchéité des TJ (Nava *et al.*, 2004). Au niveau des hépatocytes, les TJ assurent le maintien d'une polarisation complexe (**Figure 18**). En effet, ces cellules présentent plusieurs pôles basolatéraux et apicaux, séparés par les TJ. Les pôles apicaux des hépatocytes adjacents font face aux canalicules biliaires et sont impliqués dans la sécrétion de la bile, tandis que les pôles basolatéraux sont en contact avec les capillaires sinusoides (véhiculant le sang) et jouent un rôle dans la sécrétion de différents facteurs tels que les protéines du sérum (Benedicto *et al.*, 2012).



**Figure 18 :** Représentation schématique de la polarisation des hépatocytes  
(d'après Benedicto *et al.*, 2012)

La polarisation des hépatocytes est complexe, avec plusieurs membranes basolatérales (en noir) et apicales (en vert), séparées par les jonctions serrées (TJ) (en rouge). Les membranes apicales des hépatocytes adjacents font face aux canalicules biliaires (CB). Les noyaux des cellules sont représentés en gris.

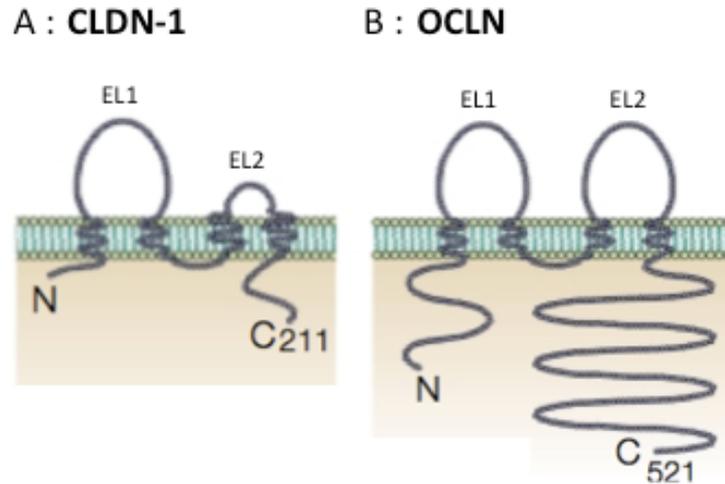
<sup>61</sup> *Coxsackie virus and Adenovirus Receptor*

CLDN-1 est composée de deux boucles extracellulaires (EL<sup>62</sup>1 et EL2), quatre TM et trois régions intracellulaires (**Figure 19A**). Particulièrement exprimée dans les hépatocytes et notamment au niveau des TJ (Yang *et al.*, 2008), CLDN-1 a été identifiée comme récepteur impliqué dans l'entrée du VHC en 2007 (Evans *et al.*, 2007). A la quête de nouveaux récepteurs du virus, les auteurs ont généré une banque d'ADNc à partir de cellules hépatiques humaines (les Huh-7.5), qu'ils ont utilisées en transfection dans des cellules HEK 293T puis dans des expériences d'infection par des VHCpp. Il a également été montré qu'en plus de CLDN-1, les CLDN-6 et 9 peuvent médier l'entrée du virus. Cependant ces deux protéines ne sont pas exprimées dans la grande majorité des lignées cellulaires sensibles à l'infection par le VHC (Meertens *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 2007). A ce jour, aucune interaction directe n'a été observée entre les glycoprotéines d'enveloppe virales et CLDN-1 (Evans *et al.*, 2007; Krieger *et al.*, 2010). L'expression de CLDN-1 dans la lignée HEK 293T suffit à lui conférer la susceptibilité à l'infection par le VHC (Da Costa *et al.*, 2012; Evans *et al.*, 2007). Avec cette expérience, c'est d'ailleurs la première fois que des cellules d'origine non-hépatique ont été rendues permissives à l'infection. D'autres équipes ont ensuite réitéré cette expérience en exprimant les CLDN-1, 6 ou 9 dans les cellules HEK (Da Costa *et al.*, 2012; Meertens *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 2007). Alors que la surexpression de CLDN-1 dans les Huh-7.5 ne semble pas influencer le niveau d'infection par des VHCcc, la réduction de son expression par ARN interférence l'inhibe fortement (Evans *et al.*, 2007). Aussi, il a été montré récemment que des anticorps anti-CLDN-1 bloquent l'infection de lignées cellulaires mais également d'hépatocytes primaires humains (Fofana *et al.*, 2010; Krieger *et al.*, 2010).

De part des études de cinétiques d'inhibition par des anticorps et des expériences d'ARN interférence, il apparaît que CLDN-1 intervient après l'étape d'attachement des particules virales à la surface cellulaire (Evans *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2012). Il semble aussi que CLDN-1 coopère avec SRB1 et CD81 (Krieger *et al.*, 2010). Le  $t_{1/2}$  nécessaire à l'inhibition de l'infection par des anticorps anti-CLDN-1 est toute fois plus élevé que pour des anticorps anti-CD81, suggérant que CLDN-1 est impliquée après CD81 dans le processus d'entrée (Evans *et al.*, 2007; Krieger *et al.*, 2010). Plusieurs études rapportent l'importance de la EL1 de CLDN-1 dans le processus d'entrée (Evans *et al.*, 2007; Meertens *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 2007).

---

<sup>62</sup> *Extracellular Loop*



**Figure 19 :** Représentation schématique de la structure de CLDN-1 et OCLN  
(d'après Tsukita *et al.*, 2001)

Bien que leurs séquences en acides aminés soient très différentes, CLDN-1 (A) et OCLN (B) ont une organisation structurale comparable : deux boucles extracellulaires (EL1 et EL2), quatre TM et trois domaines intracellulaires.

A la surface des cellules, CLDN-1 est associée avec plusieurs tétraspanines dont CD9, CD151 et de manière intéressante CD81 (Harris *et al.*, 2008; Kovalenko *et al.*, 2007; Mee *et al.*, 2009). Lorsqu'elle est surexprimée, CLDN-1 interagit avec CD81 à la membrane cellulaire mais également dans des compartiments intracellulaires, ce qui suggère une internalisation commune des deux molécules (Yang *et al.*, 2008). D'ailleurs, une étude récente montre que des sE2, VHCpp et VHCcc induisent la co-endocytose de CD81 et CLDN-1 (Farquhar *et al.*, 2012). A la membrane, la formation d'un complexe CD81-CLDN-1 a été rapportée comme essentielle au processus d'entrée du VHC (Harris *et al.*, 2010). En effet, des mutations ponctuelles dans la EL1 de CLDN-1 au niveau des acides aminés 32 et 48 bloquent la capacité de CLDN-1 à la fois à interagir avec CD81, mais également à médier l'infection. Inversement, les auteurs ont muté ces résidus dans CLDN-7, qui n'est naturellement pas un récepteur du VHC, lui conférant ainsi la capacité d'interagir avec CD81 et de faciliter l'infection. L'importance de la formation du complexe CD81-CLDN-1 a également été illustrée par le fait que les anticorps anti-CLDN-1 neutralisant l'infection abolissent l'interaction entre CLDN-1 et CD81 (Krieger *et al.*, 2010). L'une des hypothèses est que CLDN-1 pourrait moduler l'interaction entre CD81 et les glycoprotéines d'enveloppe. Dans ce sens, il a été montré que des anticorps anti-CLDN-1 empêchent la liaison de protéines E2 recombinantes et de VHCcc sur des

cellules permissives. Cela suggère que l'interaction virus-complexe de récepteurs, nécessaire à l'internalisation des particules virales, est favorisée par l'association de CLDN-1 à CD81 (Krieger *et al.*, 2010). Cette année, une équipe a réalisé une étude de prédiction des résidus de CLDN-1 et CD81 impliqués dans leur interaction mutuelle (Davis *et al.*, 2012). Par des analyses de modélisation et de mutagenèse dirigée, ils ont publié que les acides aminés 149, 152 et 153 de la LEL de CD81 seraient essentiels à son interaction avec CLDN-1. Comme prédit par des études antérieures, c'est au sein de la EL1 de CLDN-1 que se situent les résidus importants de CLDN-1. Deux régions joueraient un rôle : les résidus 33 à 35 participeraient à l'interaction en stabilisant la structure de EL1, et les acides aminés 63 et 66 interagiraient directement avec CD81. Les auteurs ont étudié l'effet des mutations des résidus 32 et 48 dans leur modèle et proposent qu'ils ne soient pas impliqués directement dans l'interaction avec CD81 mais qu'ils induisent la formation de structures tertiaires la perturbant fortement.

Puisque CLDN-1 est impliquée dans l'entrée virale et étant donné la polarisation des cellules hépatiques, la question du rôle des molécules de CLDN-1 jonctionnelles dans l'entrée du VHC a rapidement été posée. Ainsi, il a été proposé que le complexe SRB1-CD81 puisse migrer vers les TJ afin d'interagir avec CLDN-1 (Brazzoli *et al.*, 2008). D'autres études montrent d'ailleurs qu'il pourrait y avoir une corrélation entre la permissivité des cellules et la présence de CLDN-1 au niveau des TJ (Liu *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2008). Cependant, les évidences convergent plus vers une utilisation de la CLDN-1 non-jonctionnelle par le VHC. En effet, il a été montré qu'une CLDN-1 mutée dans son domaine C-terminal, région impliquée dans les interactions avec des protéines intracellulaires au sein des TJ, conserve ses compétences en tant que récepteur du virus (Evans *et al.*, 2007). Également, il a été rapporté que l'infectivité des VHCpp et des VHCc est augmentée lorsque la formation des TJ est inhibée (Mee *et al.*, 2008; 2009). De plus, des expériences de suivi de particules uniques réalisées avec du virus infectieux marqué par des sondes fluorescentes montrent que le complexe virus-SRB1-CD81 est acheminé vers les protéines CLDN-1 non associées aux TJ (Coller *et al.*, 2009). Des études sur plusieurs modèles *in vitro* ont rapporté que l'infection par le VHC peut altérer l'intégrité des TJ et dépolariiser les cellules (Benedicto *et al.*, 2008; Mee *et al.*, 2010; Wilson *et al.*, 2012). Récemment, Wilson et collaborateurs ont montré que l'endommagement des TJ favorise une dé-différentiation des cellules épithéliales en cellules mésenchymateuses non polarisées à la capacité migratoire augmentée, et ce en raison d'une baisse

d'expression de la cadhérine E, une molécule d'adhésion (Wilson *et al.*, 2012). De manière importante, les auteurs proposent que ce mécanisme puisse contribuer à la formation des carcinomes hépatocellulaires chez les patients chroniquement infectés. Par ailleurs, la polarisation des hépatocytes est une condition importante à la sécrétion et l'écoulement de la bile dans les canalicules biliaires. Il est ainsi admis que l'altération des TJ est étroitement liée au développement de la cholestase, une pathologie associée à une diminution, voire un arrêt, de circulation de la bile (Trauner *et al.*, 1998). Le dysfonctionnement des TJ post-infection par le VHC pourrait expliquer les cholestases observés dans les cas de récurrences d'hépatite C chez certains patients (Doughty *et al.*, 1998).

Le rôle de CLDN-1 au cours du passage du virus de cellule à cellule a été étudié et il semble que cette protéine soit nécessaire à cette voie de transmission (Brimacombe *et al.*, 2011; Timpe *et al.*, 2008). Enfin, étant donné le rôle crucial joué par CLDN-1 au cours de l'entrée virale, une équipe a étudié le potentiel thérapeutique de plusieurs peptides mimant une partie de la séquence de CLDN-1 (Si *et al.*, 2012). Cette étude a montré que l'infection par des VHCcc peut être inhibée par un peptide, et ce sans cytotoxicité *in vitro* ni altération de la localisation de CLDN-1.

#### ❖ *OCLN, une autre protéine des TJ*

Par une approche de screening d'une banque d'ADNc provenant de cellules Huh-7.5, Ploss et collaborateurs ont recherché des gènes capables de rendre permissives au VHCpp des cellules murines (NIH-3T3) exprimant les versions humaines de SRB1, CD81 et CLDN-1 (Ploss *et al.*, 2009). De cette manière, ils ont identifié une nouvelle protéine cellulaire impliquée dans l'entrée du VHC : OCLN. Comme CLDN-1, il s'agit d'une protéine des TJ, composée de quatre TM, deux boucles extracellulaires (EL1 et EL2) et trois régions intracellulaires (**Figure 19B**).

La réduction de l'expression d'OCLN dans des cellules permissives diminue considérablement l'infection par des VHCpp et VHCcc, alors que la surexpression de cette protéine dans des lignées résistantes permet d'augmenter significativement leur infectabilité (Liu *et al.*, 2009; Ploss *et al.*, 2009). Des expériences d'ARN interférence ont également montré que OCLN intervient après l'étape d'attachement des particules virales à la surface cellulaire et suggèrent qu'elle serait impliquée à une étape tardive du

processus d'entrée (Benedicto *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2012). Aussi, ces expériences montrent que l'absence d'expression de OCLN n'affecte ni le niveau d'expression ni la localisation de CLDN-1, ce qui suggère que ces deux protéines des TJ interviennent séparément lors de l'entrée virale. Un rôle de OCLN au cours de la fusion a été proposé puisque l'ARN interférence de OCLN dans des cellules Huh-7 affecte leur capacité de fusion avec des cellules HEK 293T exprimant les glycoprotéines d'enveloppe du VHC (Benedicto *et al.*, 2009). A ce jour, il n'est pas clairement défini si OCLN interagit directement avec E2. Certaines études le montrent en utilisant des cellules en culture infectées par les VHCcc ou dans des expériences de pull-down (Benedicto *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2009), mais des études complémentaires seront nécessaires afin de le confirmer. Récemment par exemple, il a été montré qu'un mutant de OCLN dépourvu de la EL2 ne médie plus l'entrée du virus et ne co-immunoprécipite plus E2. Pourtant, dans cette même étude, les auteurs ne mettent pas en évidence une interaction entre EL2 et sE2 (Liu *et al.*, 2010). Il semble que les déterminants de OCLN impliqués dans l'infection soient situés au niveau de cette EL2 (Ploss *et al.*, 2009). En accord avec cela, l'étude de Liu et collaborateurs a montré que cette région est indispensable à son activité de co-récepteur pour le virus (Liu *et al.*, 2010). Egalement, il a été rapporté qu'un motif MARVEL au sein la protéine est indispensable à son rôle (Kohaar *et al.*, 2010). Les auteurs montrent aussi que diverses isoformes de OCLN co-existent dans les cellules hépatiques et suggèrent, par des expériences *in vitro*, que la diversité des isoformes de OCLN pourrait contribuer au tropisme du VHC.

En 2009, l'équipe de Ploss a pour la première fois montrer que des cellules d'origine non-humaine, telles que NIH-3T3 murines, peuvent être rendues permissives à l'infection par le VHC via l'expression des quatre récepteurs humains : SRB1, CD81, CLDN-1 et OCLN (Ploss *et al.*, 2009). Aussi, ils ont proposé que CD81 et OCLN soient les déterminants de la restriction d'espèce du virus. En effet, alors que les protéines SRB1 et CLDN-1 provenant de la souris sont capables de médier l'infection à des niveaux comparables aux protéines humaines, CD81 et OCLN (plus précisément sa EL2) doivent être d'origine humaine afin de rendre permissives les cellules NIH-3T3. Toutefois, il a été montré plus tard que OCLN issue de souris permet de restaurer partiellement l'infection par des VHCcc (Ciesek *et al.*, 2011a). De plus, la mutation de deux acides aminés dans la EL2 de OCLN (résidus 223 et 224) suffit à rendre la protéine issue de la souris hautement compétente et inversement, le remplacement de ces deux résidus au

sein de la protéine humaine affecte sa capacité à médier l'entrée du virus. Enfin, il a récemment été montré que OCLN provenant du toupaye permet de restaurer l'infection par des VHCcc à des niveaux comparables à OCLN d'origine humaine dans des cellules NIH-3T3 exprimant les protéines humaines SRB1, CD81 et CLDN-1, ce qui pourrait à l'avenir faciliter la construction d'un modèle animal de petite taille et susceptible à l'infection (Tong *et al.*, 2011).

La protéine OCLN semble nécessaire à l'infection directe mais également à la transmission de cellule à cellule du virus. En effet, plusieurs équipes ont rapporté un rôle de OCLN au cours du passage du virus de cellule à cellule (Brimacombe *et al.*, 2011; Ciesek *et al.*, 2011a; Ploss *et al.*, 2009).

#### ❖ *Les molécules récemment impliquées dans l'entrée du VHC*

Ces deux dernières années, plusieurs études ont rapporté l'importance de nouvelles molécules dans le processus d'entrée virale. Parmi elles, la scramblase 1 (Sc1) (Gong *et al.*, 2011), EGFR et EphA2 (Lupberger *et al.*, 2011) ainsi que le récepteur NPC1L1 (Sainz *et al.*, 2012).

La Sc1 est une protéine membranaire impliquée dans les mouvements lipidiques d'une couche à l'autre des membranes dépendamment de la présence d'ions calcium. Un screening double hybride en levure réalisé dans le but de trouver des molécules cellulaires capables d'interaction avec E1 et E2 a permis à Gong et son équipe d'identifier Sc1. Son rôle dans le cycle du VHC a ensuite été vérifié (Gong *et al.*, 2011). Notamment, la réduction de son expression par ARN interférence diminue l'infection par des VHCpp et VHCcc. Les auteurs montrent aussi que la Sc1 est nécessaire à l'attachement des particules virales à la surface des cellules et ils suggèrent qu'elle pourrait également intervenir au cours de l'étape d'endocytose dépendante de la clathrine.

En 2011 également, Lupberger et collaborateurs ont publié l'importance des récepteurs tyrosine kinase (RTK) dans l'infection par le VHC (Lupberger *et al.*, 2011). Plus précisément, ils se sont attachés à décrire l'implication de EGFR et EphA2 au cours du cycle viral. Dans cette étude, il est montré que l'inhibition de l'expression de ces deux

RTK par ARN interférence diminue l'infection par des VHCcc et VHCpp de différents géotypes, sans altérer la capacité des cellules à fixer sE2. De plus, l'engagement de EGFR et EphA2 par leurs ligands induit une augmentation de l'infection. Ces deux RTK présentent l'avantage de pouvoir être ciblés par des inhibiteurs de protéines kinases (PKI) spécifiques et utilisés actuellement dans la thérapie de certains cancers. Ainsi, l'erlotinib (inhibiteur de EGFR) et le dasatinib (inhibiteur de EphA2) diminuent l'infection par des VHCpp et VHCcc *in vitro*, en cellules Huh-7.5.1 et HepG2-CD81. En hépatocytes primaires humains, ces PKI réduisent l'infection par les VHCpp et des particules virales issues de patients infectés. L'effet de l'erlotinib a été évalué *in vivo* sur l'infection de souris uPa/SCID et il a été montré qu'un traitement de 30 jours avec ce PKI n'empêche pas l'infection mais retarde ses cinétiques. *In vitro*, l'erlotinib et le dasatinib diminuent l'infection lorsqu'ils sont ajoutés après l'étape d'attachement et des cinétiques d'inhibition indiquent également que ces RTK jouent un rôle à une étape tardive de l'entrée virale. Des expériences de FRET montrent d'ailleurs que les inhibiteurs de EGFR et EphA2 bloquent la formation du complexe CD81-CLDN-1. En plus de ce rôle de médiateur de l'interaction de CD81 avec CLDN-1, il est montré que ces deux RTK pourraient être impliqués dans la fusion des membranes dépendamment des glycoprotéines d'enveloppe. Enfin, les auteurs mettent en évidence un rôle de ces RTK dans la transmission cellule à cellule du virus.

NPC1L1 est un récepteur impliqué dans le transport du cholestérol. Il a été rapporté récemment qu'il joue un rôle au cours de l'infection par le VHC, dépendamment du contenu en cholestérol des LVP (Sainz *et al.*, 2012). La réduction de son expression par ARN interférence ou l'utilisation d'anticorps anti-NPC1L1 bloque l'entrée des VHCcc à une étape post-attachement des particules virales. De manière intéressante, un antagoniste de NPC1L1, l'ezetimib, est approuvé en clinique dans le traitement de l'hypercholestérolémie. Cette étude rapporte l'effet inhibiteur de l'infection de cette molécule. De plus, il est montré que NPC1L1 agit probablement au moment de la fusion ou juste avant cette étape. De la même manière que l'erlotinib, l'ezetimib a été testé chez des souris au foie humanisé. Un traitement de deux semaines avant inoculation avec un virus de génotype 1b permet de retarder l'infection voire, pour quelques souris, de protéger complètement l'animal.

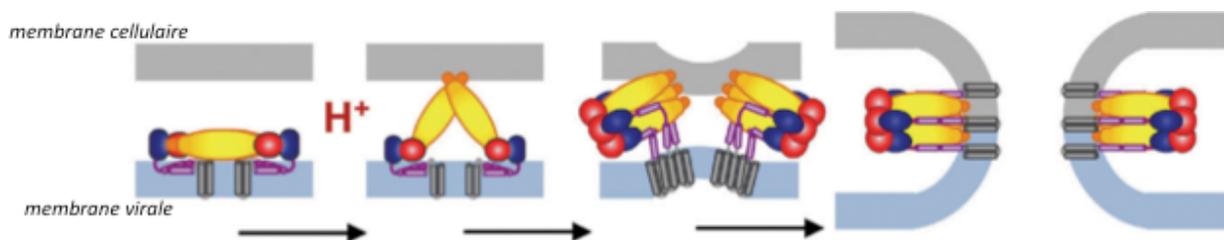
### 3. L'endocytose et la fusion

Une fois les interactions avec les récepteurs de la surface cellulaire établies, le VHC est internalisé. Cette étape est médiée par une endocytose dépendante de la clathrine. En effet dans plusieurs études, la réduction de l'expression de protéines associées au processus d'endocytose clathrine-dépendant a permis de confirmer l'importance de cette voie d'internalisation pour l'entrée du VHC (Blanchard *et al.*, 2006; Coller *et al.*, 2009; Meertens *et al.*, 2006). Après l'étape d'endocytose, les virus peuvent fusionner soit au sein des endosomes précoces, soit au sein des endosomes tardifs. Dans le cas du VHC, le virus est internalisé jusqu'aux endosomes précoces et non tardifs. Cela a été montré dans des expériences utilisant des dominants négatifs de protéines nécessaires à la formation des endosomes et dans des études de colocalisation de particules virales marquées avec des protéines spécifiques des endosomes précoces (Coller *et al.*, 2009; Meertens *et al.*, 2006).

Après l'endocytose, les particules virales se retrouvent à l'intérieur des endosomes précoces. Le virus doit ensuite fusionner avec la membrane de l'endosome de manière à libérer sa capsid et son génome dans le cytoplasme afin que la suite du cycle viral puisse avoir lieu. Cette fusion des membranes virale et endosomale est dépendante de plusieurs facteurs. Tout d'abord, le pH est un élément clé de régulation de cette étape. En effet, des expériences réalisées *in vitro* avec des liposomes montrent que le pH optimum requis pour cette fusion est d'environ 5,5 pour les VHCpp et 5,0 pour les VHCcc (Haid *et al.*, 2009; Lavillette *et al.*, 2006). De plus, des inhibiteurs de l'acidification des endosomes, tels que la Bafilomycine A1, la Concanamycine A ou encore le NH<sub>4</sub>Cl, bloquent l'entrée du virus en empêchant l'étape de fusion (Blanchard *et al.*, 2006; Koutsoudakis *et al.*, 2006; Meertens *et al.*, 2006; Tscherne *et al.*, 2006). Il a été montré que la température régule également ce processus, puisque la fusion est bloquée à 4°C (Haid *et al.*, 2009; Lavillette *et al.*, 2006). Il semble aussi que le cholestérol facilite la fusion des membranes. D'ailleurs, une corrélation a été établie en système HCVcc entre la faible densité des LVP et une meilleure fusogénicité (Haid *et al.*, 2009).

Contrairement à d'autres virus enveloppés, les particules extracellulaires du VHC ne sont pas sensibles à un traitement par pH acide, suggérant que les particules deviennent compétentes pour la fusion après une (des) interaction(s) avec l'un ou plusieurs de ses récepteurs de surface cellulaire (Meertens *et al.*, 2006; Tscherne *et al.*, 2006). La résistance des particules virales au pH acide pourrait être liée aux

glycoprotéines d'enveloppe qui sont présentes sous forme de complexes covalents stabilisés par des ponts disulfures à la surface du virus (Vieyres *et al.*, 2010). Comme décrit précédemment, il a été proposé que CD81 pourrait être responsable du passage du virus de l'état de résistance à l'état de sensibilité au pH acide (Sharma *et al.*, 2011). Ainsi, en interagissant avec CD81, les glycoprotéines d'enveloppe virale verraient leur conformation modifiée, les rendant sensibles au pH acide des endosomes. De part l'acidité de ce compartiment, E1 et E2 prennent ensuite une conformation active qui permet la fusion des membranes. Concernant les régions de E1 et E2 impliquées dans le processus de fusion, les données restent controversées. En effet, certains décrivent que les domaines importants sont situés à la fois dans E1 et E2 (Haid *et al.*, 2009; Lavillette *et al.*, 2006). Par contre, dans le modèle de Krey et collaborateurs, un peptide de fusion est prédit au sein de E2, par analogie avec d'autres protéines de fusion de classe II. Cela suggère que le VHC fusionne à la manière d'autres *Flavivirus* pour lesquels la protéine E induit des réarrangements membranaires après sa réorganisation en trimères (Fritz *et al.*, 2008) (**Figure 20**). Egalement, des mutations au niveau des TM des glycoprotéines d'enveloppe peuvent perturber la fusion (Ciczora *et al.*, 2007).



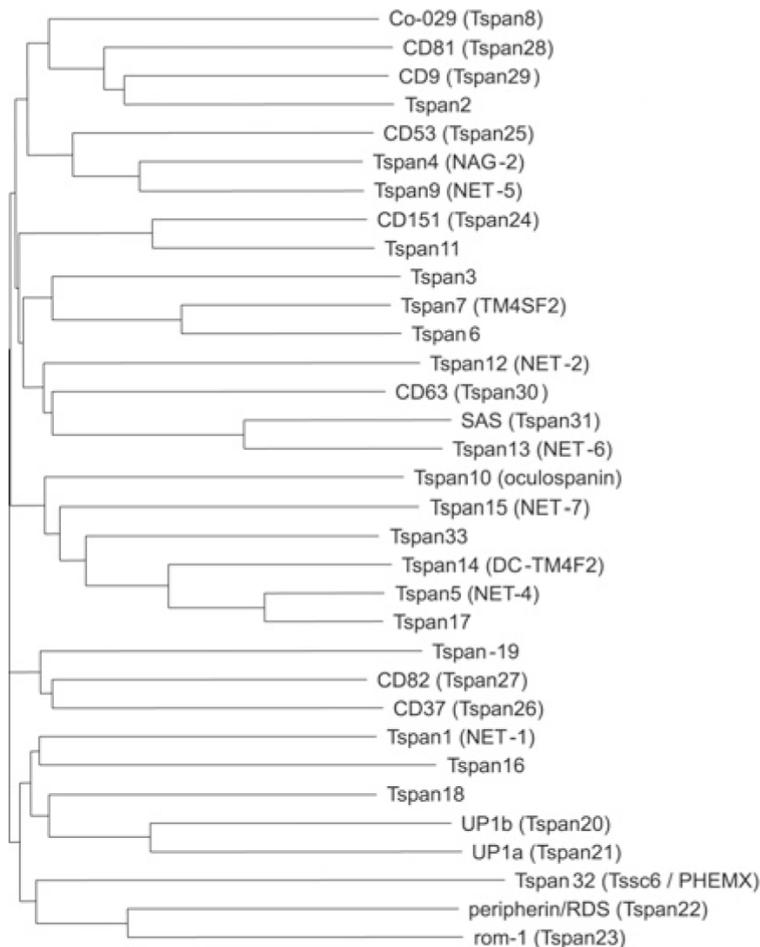
**Figure 20 : Représentation schématique de la fusion de la glycoprotéine E des *Flavivirus***  
(d'après Fritz *et al.*, 2008)

Le code couleur est le suivant : rouge = DI, jaune = DII, bleu = DIII, orange = peptide de fusion, violet = région ST, gris = région transmembranaire.

1) Les dimères à la surface de la particule virale. 2) A pH acide, les dimères se dissocient et un changement de conformation des glycoprotéines d'enveloppe amène le peptide de fusion à interagir avec la membrane cellulaire. 3) Les glycoprotéines s'organisent en trimères, les régions DIII et ST sont relocalisées. 4) La fusion a lieu, les glycoprotéines forment des trimères et le pore est ouvert.

## D. Les tétraspanines, leurs partenaires et les TEM

Les tétraspanines forment une famille de protéines membranaires conservées au cours de l'évolution. En effet, elles sont retrouvées dans de nombreux organismes tels que les animaux, les plantes, les champignons, les amibes, et certains protozoaires (Huang *et al.*, 2005b). L'identification de cette famille remonte à la fin des années 1980, avec le clonage successif de plusieurs de ses membres : CD37 (Schwartz-Albiez *et al.*, 1988), CD63 (Hotta *et al.*, 1988), CD81 (Oren *et al.*, 1990), CD9 (Boucheix *et al.*, 1991) et CD53 (Wright *et al.*, 1993). Les séquences protéiques de ces différentes tétraspanines présentent une forte homologie. Chez l'Homme, 33 membres des tétraspanines sont répertoriés à ce jour (**Figure 21**) (Charrin *et al.*, 2009b). Leur homologie de séquence et la conservation de l'organisation des gènes codant pour les tétraspanines suggèrent qu'elles dérivent d'un ancêtre commun lointain par une succession de duplications et de divergences (Garcia-España *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2010).



**Figure 21 :** Arbre phylogénétique des tétraspanines humaines (d'après Charrin *et al.*, 2009)

Au cours de ce chapitre, nous verrons que les membres de la famille des tétraspanines présentent une structure caractéristique conservée. Aussi, ces protéines interagissent les unes avec les autres mais également avec d'autres protéines, appelées partenaires, afin de former des microdomaines particuliers, les « *tetraspanin webs* » encore appelés TEM<sup>63</sup>, qui peuvent participer aux fonctions biologiques des tétraspanines ou de leurs partenaires. Enfin, nous aborderons les différents rôles joués par les tétraspanines au cours de nombreux processus cellulaires et, plus particulièrement, au cours de l'infection par divers pathogènes.

## 1. La structure des tétraspanines

Les tétraspanines sont caractérisées par leur structure qui, comme leur nom l'indique, implique quatre TM. Ce sont de petites protéines (de 204 à 355 acides aminés) qui, à l'image de CD81 (**Figure 16A**), possèdent des extrémités N et C-terminales cytoplasmiques et deux domaines extracellulaires de tailles inégales : une petite (la SEL) et une grande boucle (la LEL). Elles se distinguent des autres familles à quatre TM par deux caractéristiques structurales majeures : les tétraspanines possèdent 4 à 8 résidus cystéine extracellulaires conservés dont un motif CCG, ainsi que des acides aminés polaires dans les régions TM. Également, elles peuvent présenter diverses modifications post-traductionnelles (Boucheix & Rubinstein, 2001; Charrin *et al.*, 2009b). En général, les tétraspanines sont N-glycosylées au niveau de la LEL mais il existe des exceptions, telles que CD9 qui est glycosylée dans la SEL (Boucheix *et al.*, 1991) et CD81 qui n'est pas glycosylée (Oren *et al.*, 1990). Aussi, certaines tétraspanines comme par exemple CD9, sont acylées (Seehafer *et al.*, 1988) et d'autres ubiquitinylées ((Lineberry *et al.*, 2008; Tsai *et al.*, 2007)). Enfin, des cystéines intracellulaires juxtamembranaires sont palmitoylées, cette modification jouant un rôle crucial dans l'établissement des TEM (Berditchevski, 2002; Kovalenko *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2002)). Les domaines intracellulaires et transmembranaires des tétraspanines sont plus conservés que les domaines extracellulaires. En général, chaque domaine structural est associé à des fonctions spécifiques (Stipp *et al.*, 2003b). Ainsi, les boucles extracellulaires jouent un rôle dans les interactions avec des ligands ou d'autres protéines membranaires, les régions cytoplasmiques sont impliquées dans des interactions avec le cytosquelette et

---

<sup>63</sup> *Tetraspanin-Enriched Microdomains*

des voies de signalisation intracellulaire, et enfin les régions TM stabilisent les tétraspanines en terme de structure et participent aux interactions entre les tétraspanines et d'autres protéines.

### a) Les boucles extracellulaires

Les tétraspanines possèdent deux boucles extracellulaires : la SEL et la LEL. De manière générale, la SEL des tétraspanines est moins décrite. C'est une région de petite taille (20 à 28 résidus) et sa séquence est peu conservée. Concernant ses fonctions, elles restent peu connues pour la majorité des tétraspanines. Toutefois, il a été montré que la SEL de CD81 pouvait participer à la stabilisation de la structure de la LEL (Masciopinto *et al.*, 2001; Yalaoui *et al.*, 2008b). D'ailleurs, d'un point de vue structural, la SEL des tétraspanines contient en général un feuillet  $\beta$  hydrophobe qui est prédit comme interagissant avec des régions de la LEL (Seigneuret, 2006).

La LEL est un domaine plus large (76 à 131 acides aminés) dont la séquence est également variable. Comme déjà évoqué, la structure tridimensionnelle de la LEL de CD81 a été décrite en 2001 et en 2012 (Kitadokoro *et al.*, 2001; Rajesh *et al.*, 2012). La modélisation de la LEL d'autres tétraspanines montre une structure proche de celle de la LEL de CD81 (**Figure 16B**), avec un « pied » formé par les hélices a et e et une « coiffe » composée des hélices b, c et d, ces deux dernières correspondant à la région hypervariable de la LEL (Bienstock & Barrett, 2001; Seigneuret, 2001). Malgré une grande variabilité de séquence, les hélices a, b et e de la LEL présentent une structure conservée, contrairement aux domaines c et d dont la structure varie entre les tétraspanines. Au niveau de l'hélice b, un motif CCG (Cystéine-Cystéine-Glycine) est conservé chez toutes les tétraspanines, de même que deux autres cystéines, l'une au sein de l'hélice e, l'autre dans la région hypervariable de la LEL. Ces cystéines, présentes à distance constante de la membrane, sont engagées dans la formation de ponts disulfures qui stabilisent la structure de la LEL. Le nombre de ponts disulfure présents dans la LEL des tétraspanines est donc au minimum de deux et peut aller jusqu'à quatre (Seigneuret, 2001). Ainsi, la majorité des tétraspanines contiennent trois ponts disulfures (groupe 2 : CD37, CD151, CD82, ...), d'autres n'en possèdent que deux (groupe 1 : CD81, CD9, CD53, ...) et certaines en comptent quatre (groupe 3 : Tspan-5...). Les hélices c et d, constituant le domaine variable des LEL, confèrent la spécificité à chaque tétraspanine.

Comme vu précédemment, cette région semble impliquée dans l'interaction entre CD81 et E2 du VHC. Egalement, un motif SFQ situé dans cette région de CD9 est nécessaire au cours du processus de fusion des gamètes (Zhu *et al.*, 2002), et un autre motif dans ce domaine de CD9 est impliqué dans la régulation de la liaison de la toxine diphtérique (Hasuwa *et al.*, 2001). Aussi, la liaison de CD151 avec les intégrines dépend de deux régions situées dans ce domaine variable (Kazarov *et al.*, 2002; Yamada *et al.*, 2008). Enfin, comme déjà évoqué, la plupart des LEL est N-glycosylée en un ou plusieurs sites, à l'exception de CD9, glycosylée au niveau de la SEL, et de CD81, non glycosylée (Levy & Shoham, 2005a).

### **b) Les segments transmembranaires**

Les TM des tétraspanines sont les régions présentant le plus d'homologie. Ces segments, et particulièrement les TM1, 3 et 4, contiennent des résidus polaires hautement conservés (asparagine, acide glutamique, glutamine). La présence de ces résidus polaires dans un environnement hydrophobe suggère qu'ils seraient impliqués dans des interactions entre les tétraspanines et d'autres protéines membranaires, mais également dans la stabilisation des tétraspanines via des liaisons TM-TM (Levy & Shoham, 2005b). D'ailleurs, dans le modèle de la structure de CD82, ces résidus sont prédits pour être plutôt situés aux interfaces internes TM-TM (Bienstock & Barrett, 2001). Les TM jouent un rôle dans l'interaction des tétraspanines avec des protéines membranaires, que ce soit d'autres tétraspanines ou des partenaires. En effet, il a été montré que les interactions homotypiques CD151-CD151 seraient médiées par les TM plus que par la LEL (Berditchevski, 2001). De plus, un motif riche en glycine (GXXXG) présent au sein du TM1 de CD81 pourrait être important pour l'interaction de cette tétraspanine avec d'autres protéines via les TM (Russ & Engelman, 2000); (Berditchevski & Odintsova, 2007; Shoham *et al.*, 2006). Concernant CD81, il a récemment été montré que les TM3 et 4 sont nécessaires pour son interaction avec les partenaires EWI-2 et EWI-2wint (Montpellier *et al.*, 2011). Les TM participent également à la biogénèse et l'adressage des protéines en surface. Des mutants des TM1-2, 2-3 ou 1-2-3 de CD151 ainsi que la délétion du TM1 de CD82 entraînent la rétention de ces deux tétraspanines dans le RE (Berditchevski, 2001; Cannon & Cresswell, 2001). La délétion des TM2-3 de CD82 provoque également une mauvaise mise en

conformation de sa LEL. Au niveau de CD9, des délétions de ses TM2-3 empêchent son expression en surface (Toyo-oka *et al.*, 1999). Enfin, les TM des tétraspanines peuvent aussi influencer l'expression de leurs partenaires en surface. C'est le cas par exemple du TM1 de CD81 qui est suffisant à l'adressage à la membrane de CD19, une protéine de la famille des Ig (Shoham *et al.*, 2006). Les TM présentent donc diverses fonctions cruciales en terme de biogénèse, maturation, expression et interactions protéiques.

### c) Les régions intracellulaires

Les tétraspanines présentent trois régions intracellulaires : deux extrémités N et C-terminales qui, en général, font moins de 19 acides aminés, et une petite boucle de moins de 5 résidus entre les TM2 et 3 (Boucheix & Rubinstein, 2001) (**Figure 16A**). Les séquences de ces régions sont variables et peuvent être le site de plusieurs motifs spécifiques ou modifications post-traductionnelles. Ainsi, certaines tétraspanines telles que CD63, CD82 ou CD151 possèdent un motif potentiel d'internalisation YXX $\phi$  (où  $\phi$  est un résidu hydrophobe) en C-terminal (Stipp *et al.*, 2003b). Via des interactions avec ces tétraspanines, celles qui ne possèdent pas ce motif pourraient être adressées à des compartiments intracellulaires, ce qui expliquerait la présence de nombreuses tétraspanines au niveau des endosomes et lysosomes, mais également au sein des exosomes (Escola *et al.*, 1998; Zöller, 2009). Aussi, le domaine N-terminal de certaines tétraspanines contient des lysines qui peuvent être ubiquitylées en vue de leur dégradation (Lineberry *et al.*, 2008). C'est par exemple le cas pour CD81 et CD151. Les régions intracellulaires des tétraspanines peuvent réguler les interactions latérales entre les tétraspanines et d'autres molécules, mais aussi le transport, la liaison au cytosquelette et la localisation subcellulaire de ces protéines (Levy & Shoham, 2005b; Stipp *et al.*, 2003b). Par exemple, les segments intracytoplasmiques de CD82 pourraient médier son interaction avec le cytosquelette (Lagaudrière-Gesbert *et al.*, 1998). Egalement, l'extrémité N-terminale de CD81 est importante pour la glycosylation de CD19 dans les cellules B et intervient au cours de la maturation de CD19 dans le Golgi (Shoham *et al.*, 2006).

De manière importante, les régions intracytoplasmiques des tétraspanines possèdent des cystéines palmitoylées. Cette modification consiste en l'ajout de palmitates sur des résidus cystéines, ce qui rend les protéines plus hydrophobes et peut

influencer leurs fonctions. Il a été montré par exemple que l'état de palmitoylation de CD81 module son interaction avec une isoforme de la protéine intracellulaire 14-3-3, qui régule divers processus de signalisation (Clark, 2004). Aussi, des mutations qui abolissent la palmitoylation de CD9 et CD151 altèrent leur capacité à s'associer à d'autres protéines, dont CD81 et d'autres tétraspanines, suggérant une importance de cette modification post-traductionnelle dans la formation des TEM (Berditchevski, 2002; Charrin *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2002). Concernant CD81, il a été montré que six cystéines doivent être mutées pour une inhibition maximale de la palmitoylation : cinq résidus juxtamembranaires et un sixième situé au niveau du TM2, à l'interface entre la membrane et la partie intracellulaire (Delandre *et al.*, 2009). Cette dépalmitoylation de CD81 n'influence pas son interaction avec EWI-2/EWI-2wint (Montpellier *et al.*, 2011). Cependant, associées à d'autres substitutions de cystéines du TM3, il semble que ces mutations peuvent altérer l'association de CD81 avec CD9, CD151 et EWI-2 (Delandre *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2012).

## **2. L'expression tissulaire et la localisation subcellulaire des tétraspanines**

Chez les mammifères, il semble que la plupart des cellules exprime une ou plusieurs tétraspanines. Il y a quelques années, aucune tétraspanine n'avait été retrouvée dans les deux types cellulaires suivants : les érythrocytes et les spermatozoïdes (Boucheix & Rubinstein, 2001). Mais des études plus récentes ont montré que CD9 et CD151 sont respectivement présentes au niveau de l'acrosome des spermatozoïdes et dans les érythrocytes (Ito *et al.*, 2010; Karamatic Crew *et al.*, 2004). Egalement en 2007, une nouvelle tétraspanine, nommée Penumbra, a été identifiée dans les érythroblastes, complétant ainsi le nombre de lignées hématopoïétiques exprimant cette famille de protéines (Heikens *et al.*, 2007). Sans être ubiquitaires, certaines tétraspanines telles que CD9, CD81, CD63, CD82 ou CD151 sont largement distribuées au niveau tissulaire. A l'inverse, d'autres présentent un profil d'expression plus restreint. C'est le cas notamment des tétraspanines associées à des structures spécialisées telles que les uroplakines au niveau des plaques urothéliales ou les tétraspanines Périphérine/RDS et Rom-1 au niveau de la rétine. Egalement, CD53 et CD37 sont spécifiquement très exprimées dans les leucocytes et les lymphocytes B

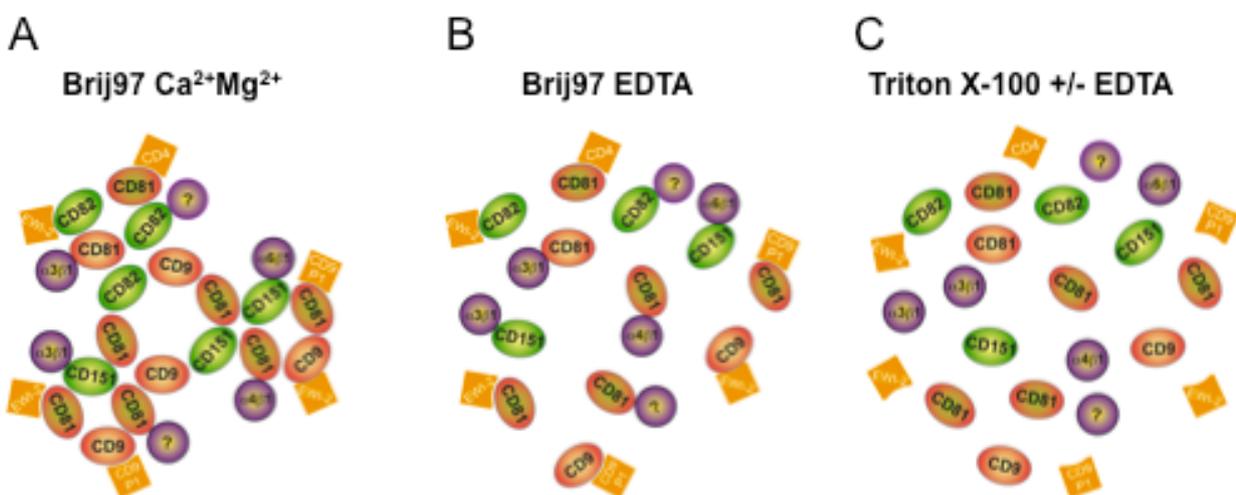
respectivement (Boucheix & Rubinstein, 2001). Concernant CD81, elle est exprimée tôt au cours de l'embryogenèse comme en témoigne sa présence dans les ovocytes et les œufs fécondés chez la souris, jusqu'aux premières divisions embryonnaires (Andria *et al.*, 1992). La tétraspanine CD81 est exprimée dans environ tous les tissus : cellules épithéliales, endothéliales et immunitaires, fibroblastes et un certain nombre de cellules sanguines et hématopoïétiques (Boucheix & Rubinstein, 2001; Levy & Shoham, 2005b).

Au niveau cellulaire, la plupart des tétraspanines sont localisées à la surface. Comme déjà évoqué, leurs TM jouent un rôle dans leur adressage à la membrane plasmique. Toutefois, certaines tétraspanines sont retrouvées dans des compartiments intracellulaires (endosomes, lysosomes, corps multivésiculaires) (Berditchevski & Odintsova, 2007). La plus décrite des tétraspanines localisées de manière intracellulaire est CD63, qui constitue d'ailleurs un marqueur des endosomes tardifs et des lysosomes (Rous *et al.*, 2002). Cependant d'autres tétraspanines, dont CD37, CD82, CD151 Tspan-1, Tspan-3 et Tspan-6 possèdent également le motif d'internalisation YXX $\phi$  (Stipp *et al.*, 2003b). D'ailleurs, CD37, CD82 et CD151 sont adressées au niveau des exosomes (Berditchevski & Odintsova, 2007), qui sont de petites vésicules libérées dans le milieu extracellulaire après la fusion des corps multivésiculaires avec la membrane plasmique. Dans ce sens, de nombreux types cellulaires produisent des exosomes riches en tétraspanines (Escola *et al.*, 1998; Zöller, 2009) qui pourraient jouer un rôle dans la communication intercellulaire (Rana & Zöller, 2011; van Niel *et al.*, 2006). Il a par exemple été montré que l'activation des cellules T entraîne une diminution de l'expression de CD81 en surface, en corrélation avec la libération d'exosomes contenant CD81. Ces derniers permettent le transfert des molécules de CD81 vers des cellules voisines ne l'exprimant pas (Fritzsching *et al.*, 2002). D'autres tétraspanines ne possédant pas ce motif d'internalisation peuvent aussi être retrouvées dans des compartiments intracellulaires, potentiellement via des interactions avec la dizaine de tétraspanines présentant le motif YXX $\phi$  en C-terminal (Berditchevski & Odintsova, 2007).

### 3. Les microdomaines enrichis en tétraspanines (TEM)

#### a) Caractérisation des TEM

- Le *tetraspanin web*: Les protéines de la famille des tétraspanines ont la caractéristique de s'associer entre elles mais également avec d'autres molécules, appelées alors « partenaires ». Ces interactions participent à la formation de complexes multi-moléculaires à la surface des cellules : le réseau de tétraspanines (*tetraspanin web*) ou TEM (Boucheix & Rubinstein, 2001).



**Figure 22 :** Effet de différentes conditions de détergent sur l'organisation du *tetraspanin web*

A) Le *tetraspanin web* reste intact lorsque les cellules sont lysées dans une solution contenant 1% de Brij97 et des ions divalents. B) Dans une solution contenant 1% de Brij97 et 2mM EDTA, les interactions tétraspanine-tétraspanine sont dissociées et les complexes primaires préservés. C) En condition de détergent dur (1% Triton X-100 avec ou sans EDTA) toutes les interactions au sein du *tetraspanin web* sont dissociées.

Ce réseau de tétraspanines a majoritairement été étudié dans des expériences de co-immunoprécipitation après lyse des cellules dans différents détergents, plus ou moins stringents. Après lyse en condition de détergent doux (CHAPS, Brij96, Brij97<sup>64</sup>...), le profil de co-précipitation est identique d'une tétraspanine à une autre au sein d'un même type cellulaire. En effet, ces détergents conservent intactes les interactions au sein du réseau de tétraspanines (**Figure 22A**). Au contraire, après une lyse avec des

<sup>64</sup> encore appelé Brij010

détergents plus durs tels que le Triton X-100 ou le NP40, les interactions au sein du réseau sont rompues (**Figure 22C**) (Rubinstein *et al.*, 1996; Serru *et al.*, 1999). L'ajout d'EDTA aux détergents doux permet de conserver les interactions entre les tétraspanines et leur(s) partenaire(s) moléculaire(s), mais dissocie les liaisons tétraspanines-tétraspanines (**Figure 22B**) (Charrin *et al.*, 2002). Ainsi, cette condition permet l'observation des complexes primaires, c'est-à-dire l'association entre une tétraspanine et un nombre limité de partenaires. Afin de constituer le réseau de tétraspanines, ces complexes primaires s'associent entre eux via des interactions tétraspanine-tétraspanine pour former des complexes de second ordre (**Figure 22A**).

Différents types d'expériences ont permis de mettre en évidence des interactions directes entre les tétraspanines (Charrin *et al.*, 2009b). Par exemple, Yang et collaborateurs ont décrit un anticorps anti-CD9 de faible affinité, le C9BB, dont la reconnaissance est favorisée par l'arrangement en homoclusters de CD9, mettant ainsi en évidence la présence d'interactions CD9-CD9 à la surface des cellules (Yang *et al.*, 2006). De la même manière, Silvie et collaborateurs ont généré un anticorps anti-mCD81 qui reconnaît les molécules de mCD81 associées à d'autres tétraspanines (Silvie *et al.*, 2006a). De manière plus directe et évidente, des pontages covalents ont permis de mettre en évidence des homodimères (CD9, CD81 et CD151) et des hétérodimères (CD9-CD81, CD151-CD9, CD81-CD151) de tétraspanines (Kovalenko *et al.*, 2004). Diverses applications de microscopie ont également fourni de nouvelles évidences quant à l'association directe des tétraspanines entre elles. Par exemple, la technique de FRET a été utilisée afin de confirmer des interactions homo et hétérotypiques entre tétraspanines (Barreiro *et al.*, 2008) et le suivi de particules uniques a permis d'observer les interactions CD9-CD9 et CD9 avec des zones enrichies en tétraspanines à la surface cellulaire (Espenel *et al.*, 2008).

**- L'importance de la palmitoylation :** la palmitoylation joue un rôle crucial dans l'établissement des interactions de second ordre des *tetraspanin webs*. En effet comme déjà évoqué, il a par exemple été montré que la dépalmitoylation de CD9 ou CD151 altère leur capacité à interagir avec d'autres tétraspanines (Berditchevski, 2002; Charrin *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2002). Aussi, un mutant de palmitoylation de l'intégrine  $\beta 4$  n'affecte pas la formation du complexe primaire  $\alpha 6\beta 4$ -CD151, mais dissocie les interactions secondaires, entre ce complexe primaire et d'autres tétraspanines (Yang *et*

*al.*, 2004). De manière intéressante également, il apparait que les intégrines qui participent au *tetraspanin web* soient les plus palmitoylées. Plus récemment, des travaux de suivi de molécules uniques ont comparé la dynamique de CD9 avec un mutant de palmitoylation à la surface de cellules de carcinome prostatique (les cellules PC3). Les auteurs ont ainsi montré que la palmitoylation de CD9 favorise sa liaison avec des zones enrichies en tétraspanines ainsi que les interactions CD9-CD9 en dehors de ces régions particulières (Espenel *et al.*, 2008). Enfin, Yang et son équipe ont montré que, contrairement au CD9 sauvage qui s'organise en multimères aux zones de contact entre les cellules, le CD9 dépalmitoylé est moins bien reconnu par un anticorps de faible affinité (le C9BB) et présente une répartition diffuse à la surface cellulaire. De plus, la dépalmitoylation de CD9 favorise l'association de CD9 à son partenaire EWI-2, soit en déstabilisant les homoclusters ou parce que la palmitoylation masque le domaine d'interaction entre CD9 et EWI-2 (Yang *et al.*, 2006).

**- L'environnement lipidique et la notion de TEM:** les interactions entre les tétraspanines et avec leurs partenaires se font dans un environnement lipidique particulier, riche en cholestérol et en sphingolipides notamment. Plusieurs études rapportent que les tétraspanines colocalisent avec les gangliosides (Claas *et al.*, 2001; Delaguillaumie *et al.*, 2004; Odintsova *et al.*, 2003). Aussi, il a été montré que les gangliosides jouent un rôle important dans le maintien de l'intégrité des complexes riches en CD82 (Odintsova *et al.*, 2006). De plus, une association directe entre CD9 et le ganglioside GM3 a été décrite (Ono *et al.*, 2001). Egalement, Charrin et collaborateurs ont montré que des tétraspanines, en l'occurrence CD9, CD81 et CD82, interagissent avec le cholestérol membranaire (Charrin *et al.*, 2003c). Après centrifugation en gradient de sucrose, les tétraspanines sont d'ailleurs partiellement retrouvées dans les fractions de densités légères et riches en lipides, surtout après la lyse des cellules dans des conditions de détergents qui préservent le *tetraspanin web* (Charrin *et al.*, 2003b; Claas *et al.*, 2001; Delaguillaumie *et al.*, 2004). Il existe donc une relation étroite entre les complexes à tétraspanines et les lipides membranaires et ce sont ces évidences qui ont menées au concept de microdomaines enrichis en tétraspanines ou TEM. D'autres observations appuient le rôle des lipides dans la composition des TEM. Tout d'abord, la digitonine, qui précipite le cholestérol, a la capacité de précipiter les TEM (Claas *et al.*, 2001). La méthyl- $\beta$ -cyclodextrine (M $\beta$ CD), une drogue qui extrait le cholestérol des

membranes, dissocie la plupart des interactions tétraspanine-tétraspanine lorsqu'elle est ajoutée au moment de la lyse des cellules avec un détergent doux (Charrin *et al.*, 2003c). Il a également été montré que l'enrichissement de la membrane en cholestérol augmente le marquage par l'anticorps MT81w, un anti-mCD81 qui reconnaît le mCD81 lorsqu'il est associé à d'autres tétraspanines (Rocha-Perugini *et al.*, 2009; Silvie *et al.*, 2006a). Enfin, les céramides pourraient également jouer un rôle dans l'organisation des TEM puisque l'enrichissement en céramides de la membrane par un traitement avec la sphingomyélinase (Smase) favorise aussi la reconnaissance par l'anticorps MT81w (Rocha-Perugini *et al.*, 2009).

**- Les TEM et les radeaux lipidiques :** des points communs existent donc entre la notion de TEM et les radeaux lipidiques, ces microdomaines de la membrane également enrichis en lipides et localisés dans les fractions de faibles densités après centrifugation en gradient de sucrose. Toutefois, un certain nombre de différences distinguent les TEM des radeaux lipidiques. Notamment, il semble que les TEM soient plus résistants à la déplétion en cholestérol (Claas *et al.*, 2001; Rocha-Perugini *et al.*, 2009), même si une sensibilité partielle peut être observée (Charrin *et al.*, 2003c; Silvie *et al.*, 2006a). Aussi, la sensibilité aux détergents est différente. A l'inverse des radeaux lipidiques, les TEM sont dissociés à 4°C en présence de Triton TX-100, mais résistants à 37°C en présence de Brij97 (Charrin *et al.*, 2003b; Claas *et al.*, 2001). En terme de composition protéique, ces deux types de microdomaines sont très distincts, puisque les protéines typiques des radeaux lipidiques ne sont pas associées aux TEM et inversement, aucune tétraspanine n'a été identifiée au sein des radeaux lipidiques (Hemler, 2005). Enfin, une étude de suivi de particules uniques a récemment comparé la dynamique membranaire d'une tétraspanine (CD9) et d'une molécule résidente des radeaux lipidiques (CD55) (Espenel *et al.*, 2008). Les auteurs ont montré que CD55 n'est jamais confinée dans les zones enrichies en CD9 et que les deux molécules ne co-diffusent pas, ce qui renforce les preuves que les radeaux lipidiques et les TEM sont deux types de microdomaines différents.

**- La variabilité des TEM en fonction des cellules :** enfin, il est important de noter que les TEM varient en terme de composition et de taille d'un type cellulaire à un autre. Au niveau des cellules de l'urothélium par exemple, l'association des tétraspanines UPIa et

UPIb avec leurs partenaires (UPII et UPIII) donne lieu à la formation de structures hexagonales de 16 nm constitutives des plaques urothéliales (Min *et al.*, 2006). A l'extrême inverse, des études de microscopie électronique ou de microscopie TIRF<sup>65</sup> dans d'autres types cellulaires ont montré que la taille des TEM peut atteindre 200 à 400 nm<sup>2</sup> en moyenne (Barreiro *et al.*, 2008; Espenel *et al.*, 2008; Nydegger *et al.*, 2006).

### b) Les partenaires des tétraspanines

Les tétraspanines établissent des interactions directes avec un nombre limité de protéines, appelées partenaires. Ces associations établissent les complexes primaires des TEM. De nombreuses protéines sont retrouvées associées avec des tétraspanines : des molécules d'adhésion (intégrines ...), de signalisation intracellulaire (PKC, PI4K ...), des enzymes (métalloprotéases ...), des membres de la famille des Ig (EWI-2, EWI-F) ...

<b><u>Tétraspanine</u></b>	<b><u>Partenaire(s)</u></b>
UPIa	UPII
UPIb	UPIII
CD9	EWI-2 ; EWI-F ; CLDN-1 ; ICAM-1 ; ProHB-EGF
CD63	H <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPase
CD81	EWI-2 ; EWI-F ; $\alpha$ 4 $\beta$ 1 ; CLDN-1 ; CD19
CD151	$\alpha$ 3 $\beta$ 1 ; $\alpha$ 6 $\beta$ 1 ; $\alpha$ 6 $\beta$ 4 ; VCAM-1

**Tableau 3: Exemples de partenaires moléculaires connus de tétraspanines**

UP = uroplakines ; HB-EGF = heparin binding EGF-like growth factor

<sup>65</sup> Total Internal Reflexion Fluorescence

L'interaction entre une tétraspanine et son partenaire est hautement spécifique. Par exemple, les intégrines  $\alpha3\beta1$  et  $\alpha6\beta1$  ne s'associent qu'avec CD151 (Serru *et al.*, 1999). D'ailleurs, les complexes primaires les mieux caractérisés sont ceux mettant en jeu des tétraspanines et des intégrines. D'autres exemples d'associations tétraspanine-partenaire peuvent être cités et notamment l'interaction entre CD81 et CD19 sur les cellules B, entre CD81 et CD4 sur les LT ou encore les interactions entre les tétraspanines UPIa et UPIb et les uroplakines UPII et UPIII (Shoham *et al.*, 2006; Tu *et al.*, 2002). Aussi, CD9 et CD81 ont été montrées comme interagissant directement avec CLDN-1, dans des expériences de pontage chimique ou de FRET (Harris *et al.*, 2008; 2010; Kovalenko *et al.*, 2007) (**Tableau 3**). Egalement, deux membres de la famille EWI, EWI-2 et EWI-F/CD9P-1<sup>66</sup>, sont des partenaires majeurs de CD9 et CD81 dans différents types cellulaires (Charrin *et al.*, 2001; 2003a; Clark *et al.*, 2001; Stipp *et al.*, 2001a, b). Une autre protéine de la famille EWI s'associe également avec CD81 et CD9, il s'agit de EWI-2wint un produit de clivage de EWI-2 qui sera décrit dans la **partie I.E.2.d** (Rocha-Perugini *et al.*, 2008).

### c) La dynamique des tétraspanines

Ces dernières années, l'étude de la dynamique membranaire des tétraspanines a été particulièrement riche. Notamment, en plus du FRET, les techniques de FRAP<sup>67</sup> et de suivi de molécules uniques (ou SMT<sup>68</sup>) en TIRF ont été bénéfiques à cet égard.

Le FRET permet la visualisation de l'interaction entre deux molécules marquées, ou tout au moins de leur grande proximité. La technique repose sur un transfert d'énergie fournie après l'excitation d'un fluorochrome donneur couplé à une protéine A vers un fluorochrome accepteur couplé à une protéine B (**Figure 23**). Les fluorochromes sont donc choisis de telle manière à ce que la longueur d'onde d'émission du donneur corresponde à la longueur d'onde d'excitation de l'accepteur. Ainsi après l'excitation du donneur, si les deux protéines A et B sont en interaction, il y a transfert d'énergie vers l'accepteur qui est à son tour excité de manière quantifiable.

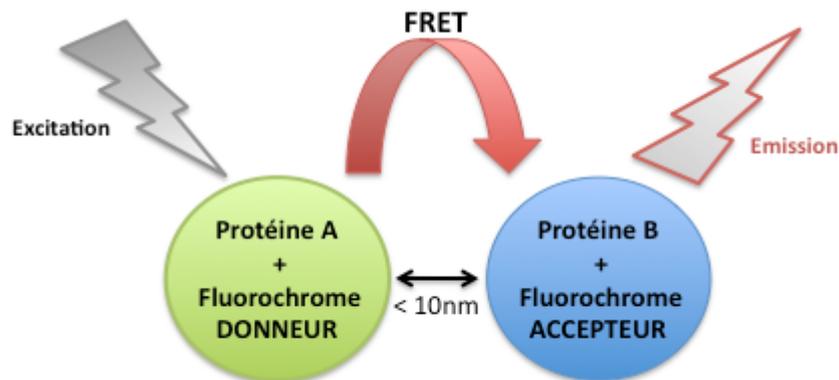
---

<sup>66</sup> *CD9-Partner 1*

<sup>67</sup> *Fluorescence Recovery After Photobleaching*

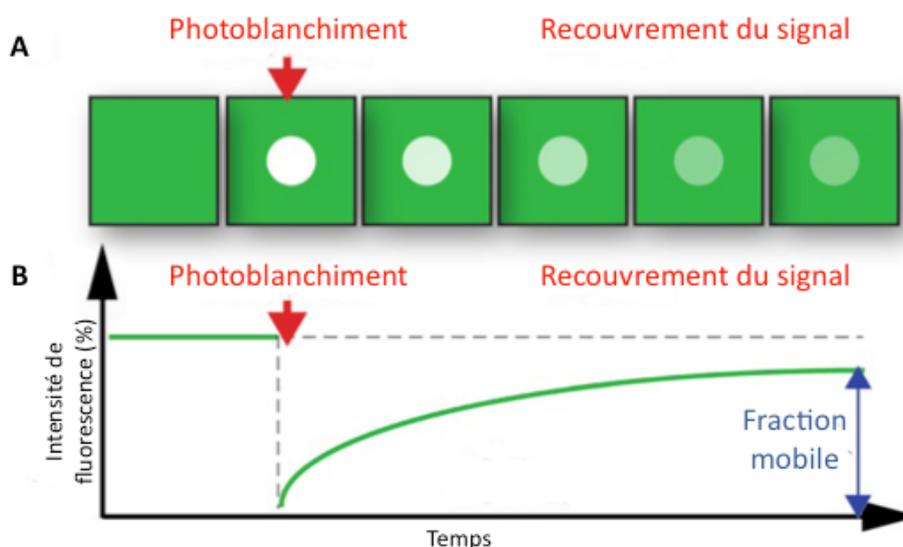
<sup>68</sup> *Single-Molecule Tracking*

Le recouvrement de fluorescence après photoblanchiment ou FRAP consiste en l'illumination brève et intense d'une zone de la membrane marquée, puis en l'analyse du retour du signal fluorescent dans cette même zone (**Figure 24**) (Lippincott-Schwartz *et al.*, 2003). La réapparition du signal est dépendante de la mobilité des molécules environnantes. Cette technique permet de définir le coefficient de diffusion d'une protéine, mais également de définir la proportion de molécules mobiles et immobiles.



**Figure 23 :** Représentation schématique de la technique de FRET

La longueur d'onde d'émission du fluorochrome donneur correspond à la longueur d'onde d'excitation du fluorochrome accepteur. De ce fait, après l'excitation du donneur, si les protéines A et B interagissent il y a un transfert d'énergie de l'accepteur vers le donneur, qui émet alors une fluorescence caractéristique. La distance minimale requise pour qu'il y ait transfert d'énergie est dépendante des fluorochromes utilisés et souvent comprise entre 1 et 10nm.

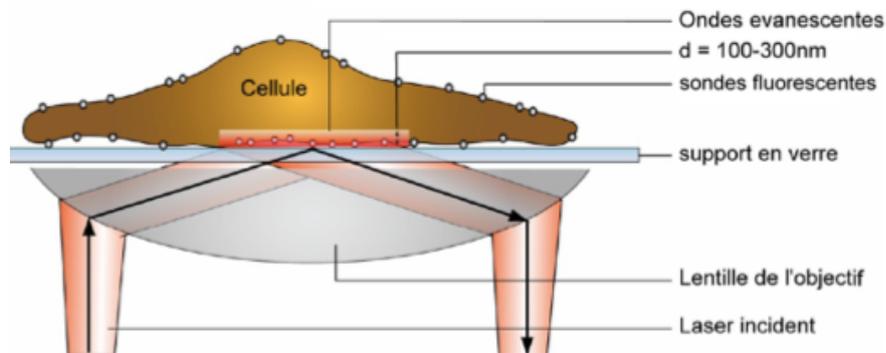


**Figure 24 :** Représentation schématique de la technique de FRAP (d'après Carman, 2011)

**A)** Le photoblanchiment d'une région définie (cercle blanc) éteint le signal membranaire. Les molécules environnantes marquées se redistribuent alors et la fluorescence augmente.

**B)** L'intensité de fluorescence maximale correspond à la fluorescence avant photoblanchiment. La courbe du recouvrement de la fluorescence en fonction du temps permet de calculer le coefficient de diffusion des molécules marquées. La fraction mobile correspond à la proportion de signal recouvert par rapport à la fluorescence de départ.

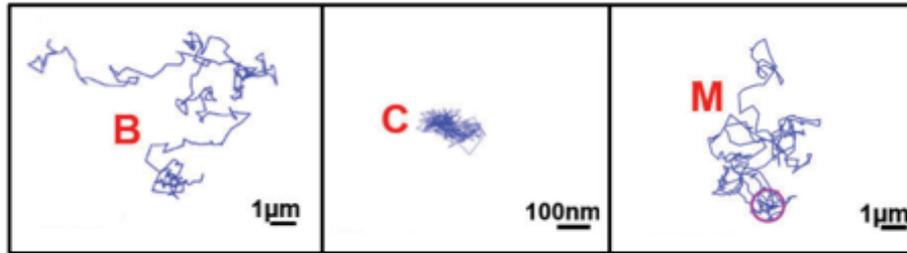
A l'échelle de la molécule unique, une technique émergente est le SMT en TIRF. Brièvement, le TIRF est un dispositif de microscopie qui utilise les ondes évanescentes d'un laser afin d'illuminer un échantillon, en l'occurrence des cellules vivantes marquées par un fluorophore (**Figure 25**). Grâce à ce système, une fine épaisseur (100-300nm) de la partie basale des cellules est illuminée, ce qui permet une observation relativement précise de la membrane basale. Associé à cela, le SMT permet un suivi précis de molécules uniques marquées en général de manière monovalente avec des Fab d'anticorps couplés à un fluorophore. Un système de localisation spatial et temporel de chaque particule marquée permet de reconstituer la trajectoire de chacune des protéines. Ensuite, grâce à l'analyse d'un grand nombre de trajectoires, les propriétés diffusives d'une molécule peuvent être déterminées (types de trajectoires, coefficient de diffusion, temps de confinement ...). Cette technique présente l'avantage de permettre l'observation de populations dynamiques hétérogènes, puisque chacune est mise en lumière sans qu'une moyenne globale ne la masque.



**Figure 25 :** Représentation schématique de la microscopie TIRF

Les ondes évanescentes issues du laser illuminent la membrane basale de la cellule sur une épaisseur d'environ 100 à 300nm.

Ces techniques ont été appliquées à l'étude des tétraspanines dans divers travaux (Barreiro *et al.*, 2008; Espenel *et al.*, 2008; Harris *et al.*, 2012; Kremmentsov *et al.*, 2010). Ainsi, les tétraspanines diffusent selon trois types de trajectoires à la surface des cellules : browniennes, confinées ou mixtes, une combinaison des deux premières (**Figure 26**).

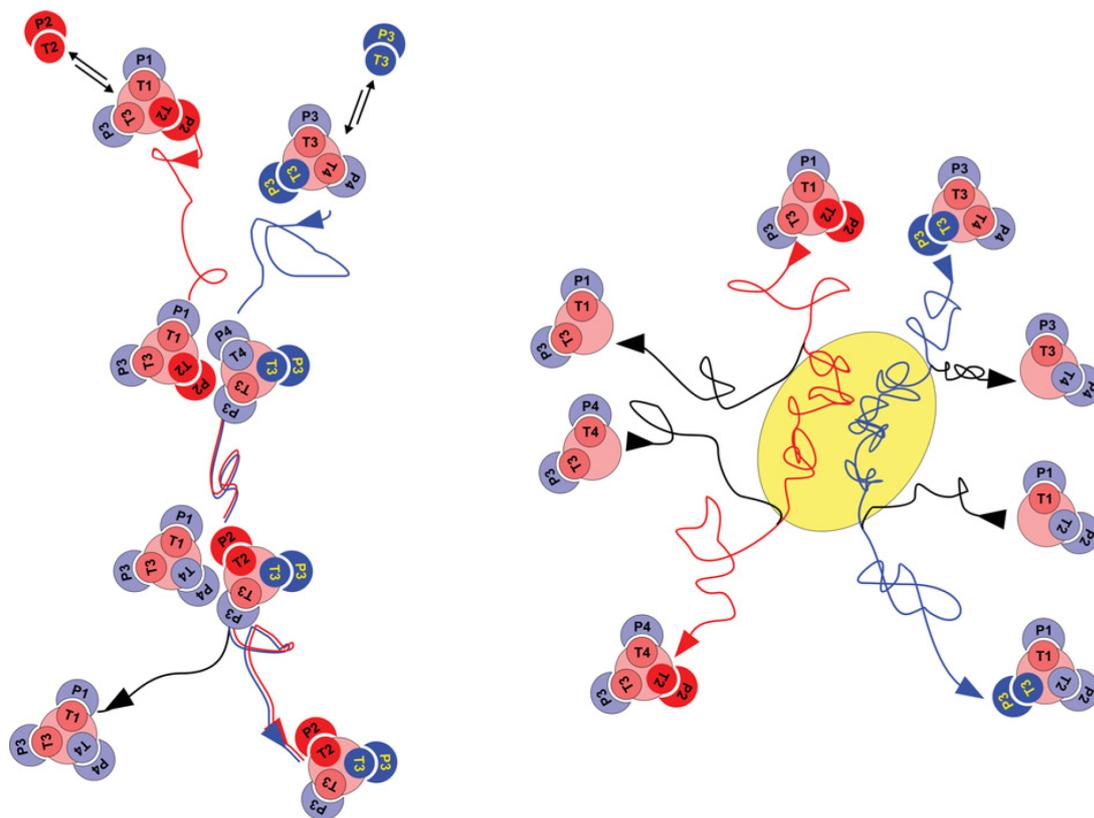


**Figure 26 :** Représentation schématique d'une trajectoire Brownienne (B), une trajectoire confinée (C) et une trajectoire mixte (M)

Comme montré dans le cas de CD9, il apparaît que la majorité des confinements sont superposables à des zones enrichies en tétraspanines, parfois appelées TEAs<sup>69</sup> (Espenel *et al.*, 2008). Ces confinements sont transitoires et dépendants de la palmitoylation puisque leur nombre diminue lorsqu'un mutant de palmitoylation de CD9 est utilisé. Cette étude a également testé le rôle du cholestérol dans la dynamique de CD9. Le traitement par la M $\beta$ CD induit une diminution du coefficient de diffusion moyen des molécules de CD9, mais également de CD55, une protéine des radeaux lipidiques, et CD46, une protéine indépendante des TEM et des radeaux lipidiques. Cela confirme que le cholestérol joue un rôle dans la fluidité globale de la membrane plasmique. Par contre, de façon spécifique aux TEM, alors que le traitement M $\beta$ CD ne modifie pas la proportion de trajectoires confinées pures de CD9 associées à des zones enrichies en CD9 et diminue le nombre de confinements transitoires (trajectoires mixtes), l'enrichissement en cholestérol la favorise. Ces résultats suggèrent que le cholestérol accessible à la M $\beta$ CD ne contribue pas à la maintenance des TEM, mais pourrait faciliter l'interaction initiale de CD9 avec les TEAs et favoriser les interactions transitoires en dehors des TEAs. Le fait que les tétraspanines interagissent en dehors des TEAs a également été montré dans une autre étude par des expériences de FRET (Barreiro *et al.*, 2008). En SMT, l'observation de la co-diffusion de deux molécules de CD9 a indiqué clairement que les tétraspanines ont la capacité de diffuser dans la membrane plasmique, de s'associer et de se dissocier de manière dynamique (Espenel *et al.*, 2008). Ces rencontres entre deux molécules de CD9 se font sans diminution du coefficient de diffusion, ce qui exclu qu'il s'agisse de deux molécules isolées. Cela implique plutôt qu'elles diffusent sous forme de petits complexes (tétraspanines-

<sup>69</sup> *Tetraspanin-Enriched Areas*

partenaires-lipides) capables de co-diffuser et d'opérer des échanges moléculaires (Charrin *et al.*, 2009b). D'ailleurs, un mutant de palmitoylation de CD9 diffuse plus rapidement que la protéine sauvage. Il se peut donc que la palmitoylation soit nécessaire à la formation ou au maintien de ces clusters dynamiques et que l'augmentation de la vitesse de diffusion soit corrélée à la plus petite taille de complexe diffusant. En effet, il est admis qu'au sein de la membrane plasmique, la taille d'un complexe est inversement corrélée à sa dynamique (Gambin *et al.*, 2006). Pour résumer, l'ensemble des études de dynamique montre que les tétraspanines diffusent dans la membrane, peuvent co-diffuser en dehors des zones enrichies en tétraspanines et sont transitoirement confinées au sein de ces zones qui sont échange permanent avec le reste de la membrane. De plus, l'environnement lipidique régule les interactions et les confinements au sein des zones enrichies en tétraspanines.



**Figure 27 :** Vue dynamique de l'organisation du *tetraspanin web*  
(d'après Charrin *et al.*, 2009)

P = partenaire moléculaire ; T = tétraspanines ; Jaune = zone de confinement enrichie en lipides

**A gauche :** deux complexes primaires (l'un bleu, l'autre rouge) sont intégrés à des complexes dynamiques qui diffusent, co-diffusent et peuvent échanger certains de leurs constituants.

**A droite :** de manière transitoire, des confinements plus stables ont lieu dans des zones particulières de la membrane plasmique.

Récemment, Charrin et collaborateurs ont proposé un nouveau modèle du *tetraspanin web*, en considérant les données accumulées jusqu'à ce jour et la notion de dynamique (**Figure 27**) : les tétraspanines et leurs partenaires se déplacent sous forme de petits complexes qui co-diffusent et sont capables d'échanger certains de leur constituants. En parallèle, des zones plus larges et enrichies en lipides peuvent confiner de manière transitoire ces petits complexes préformés (Charrin *et al.*, 2009b).

## 4. Les fonctions des tétraspanines

Diverses techniques ont permis d'étudier les fonctions des tétraspanines. Parmi elles, l'utilisation d'anticorps, la surexpression, l'ARN interférence et l'inactivation de gènes chez la souris ont été très utiles. Ainsi, une multitude de fonctions leurs sont attribuées, dans des processus cellulaires aussi divers que l'adhésion, la migration, la fusion ou la signalisation cellulaire (Levy & Shoham, 2005b).

### a) Une famille multifonctionnelle

La tétraspanine CD81 est un bon exemple de la multifonctionnalité des tétraspanines. Décrite pour la première fois dans une étude de 1990, CD81 a été identifiée comme impliquée dans la prolifération des cellules B puisque dans ces cellules, elle est la cible d'anticorps anti-prolifératifs (Oren *et al.*, 1990). Par la suite, CD81 a été retrouvée dans de nombreuses lignées cellulaires et diverses fonctions dans différents processus cellulaires lui ont été attribuées. Elle joue par exemple un rôle au sein du système immunitaire, notamment en tant que molécule de co-stimulation à la membrane des cellules T ou en participant à l'activation des cellules B (Levy & Shoham, 2005b; van Spriel, 2011). Enfin, de manière non exhaustive, CD81 joue un rôle majeur au cours des processus de fusion. Ainsi, cette tétraspanine est impliquée dans la fusion spermatozoïde-ovocyte lors de la fécondation, mais aussi dans la mise en place des syncytia de myoblastes nécessaires à la formation des myotubes et donc des muscles (Boucheix & Rubinstein, 2001; Charrin *et al.*, 2009b).

D'autres évidences peuvent illustrer l'importance de différentes tétraspanines dans des processus cellulaires. Par exemple, la surexpression de CD9 régule négativement la migration cellulaire (Powner *et al.*, 2011). Egalement, CD82 joue un rôle

inhibiteur de la migration cellulaire, dépendamment de l'internalisation de l'EGFR (Odintsova *et al.*, 2000). Comme déjà évoqué, CD151 s'associe avec des intégrines. En conséquence, CD151 module aussi l'adhésion et la migration des cellules (Liu *et al.*, 2007; Winterwood *et al.*, 2006). Ces modulations de l'adhésion et de la migration cellulaire peuvent avoir des conséquences directes *in vivo*, comme par exemple au cours du processus de métastase dans la cancérisation (Sala-Valdés *et al.*, 2012). Outre CD81, CD9 joue aussi un rôle majeur dans le processus de fusion des gamètes, notamment en régulant la distribution membranaire des intégrines  $\alpha 6\beta 1$  (Le Naour *et al.*, 2000) ; (Kaji *et al.*, 2000; Miyado *et al.*, 2000; Ziyat *et al.*, 2006). Egalement, les tétraspanines peuvent interagir avec des protéases et influencer leurs fonctions. Par exemple, la métalloprotéase ADAM10 fait partie du *tetraspanin web* et il a été montré que l'engagement de différentes tétraspanines (CD9, CD81 et CD82) par des anticorps module la capacité de ADAM10 à cliver ses substrats (Arduise *et al.*, 2008). Les auteurs proposent que les tétraspanines régulent la compartimentation de ADAM10, influençant négativement son activité protéasique. Récemment, des interactions directes entre ADAM10 et des tétraspanines possédant huit cystéines au niveau de la LEL (Tspan-C8) ont été rapportées. Il semble que ces Tspan-C8 régulent le transport intracellulaire et l'expression de la métalloprotéase à la surface des cellules (Haining *et al.*, 2012) (Rubinstein E., septembre 2012, 5th European Conference on Tetraspanins, Nijmegen, Pays-Bas).

### **b) Les tétraspanines et l'infection**

De manière intéressante, les tétraspanines participent à divers processus d'infection par différents pathogènes. En effet, plusieurs études rapportent que les tétraspanines pourraient être impliquées dans l'infection par des bactéries et des virus. Par exemple, il a été publié récemment que CD81 joue un rôle dans le processus d'entrée de la bactérie *Listeria monocytogenes* (Tham *et al.*, 2010)). Parmi les pathogènes viraux, il est établi que CD81 participe à l'entrée du VHC (Pileri *et al.*, 1998) mais également à la formation des syncytia induits lors de l'infection par le virus T-lymphotrophique humain de type 1 (HTLV-1<sup>70</sup>) (Imai & Yoshie, 1993) et le VIH (Gordón-Alonso *et al.*, 2006). Le cycle viral de ces deux derniers virus met également en jeu plusieurs autres

---

<sup>70</sup> *Human T-lymphotropic virus type 1*

tétraspanines (Monk & Partridge, 2012). Il a aussi été montré que des anticorps anti-CD63, CD81 et CD151 peuvent bloquer l'entrée du papillomavirus humain de type 16 (Spoden *et al.*, 2008). Enfin, un certain nombre de virus incorporent dans leur enveloppe des tétraspanines au moment de la sécrétion virale, parmi lesquels le virus influenza (CD9 et CD81), le virus Moloney de la leucémie murine (CD9, CD63 et CD81), le virus Vaccine (CD81) ou encore le cytomégalo virus (CD63) (Fraile-Ramos *et al.*, 2007; Krauss *et al.*, 2002; Segura *et al.*, 2008; Shaw *et al.*, 2008). En parallèle des bactéries et des virus, l'entrée du parasite *Plasmodium* est aussi dépendante de tétraspanines et plus précisément de CD81 (Silvie *et al.*, 2003).

A titre d'exemple et étant donné le sujet de mon travail de thèse, les fonctions des tétraspanines dans l'infection par le VIH et par *Plasmodium* vont être plus précisément abordées. Le rôle de CD81 dans l'entrée du VHC est développé séparément (**Parties I.C.2B et I.E**)

### ❖ *Les tétraspanines et le VIH*

Le VIH est un *lentivirus* de la famille des *rétrovirus* qui infecte les LT CD4+ ainsi que d'autres cellules présentatrices d'antigènes qui expriment CD4, telles que les macrophages. L'entrée du virus dans les cellules requiert tout d'abord une phase d'attachement à la cellule, médiée par des molécules de surface cellulaire telles que les lectines ou les GAGs. Le virus porte à sa surface deux glycoprotéines d'enveloppe organisées en trimères d'hétérodimères, gp120 et gp41, qui sont les acteurs viraux de l'entrée. Dans un premier temps, gp120 interagit avec son récepteur, CD4, ce qui induit un changement de conformation de la glycoprotéine et permet sa liaison au(x) co-récepteur(s), les plus fréquemment utilisés étant CXCR4 et/ou CCR5. La liaison au récepteur puis au(x) co-récepteur(s) entraîne un nouveau changement de conformation des glycoprotéines d'enveloppe qui, cette fois, démasque le peptide de fusion porté par gp41. Ensuite, via l'insertion du peptide de fusion dans la membrane de la cellule hôte, les membranes cellulaire et virale fusionnent. La protéine gp41 fait donc le lien entre les deux membranes (Didigu & Doms, 2012). Il est à noter que, même si une grande majorité des études décrit une fusion directe et pH-indépendante du virus à la membrane plasmique (McClure *et al.*, 1988), des études récentes ont rapporté que le VIH pourrait également entrer par endocytose clathrine-dépendante (Bosch *et al.*, 2008;

Daecke *et al.*, 2005; Miyauchi *et al.*, 2009). Quoiqu'il en soit, après l'étape de fusion, la capsid est libérée dans le cytoplasme de la cellule. Le génome est ensuite décapsidé, rétrotranscrit et transporté jusqu'au noyau de la cellule où aura lieu son intégration au génome de l'hôte ainsi que la transcription. Les ARNm sont ensuite exportés hors du noyau et traduits dans le cytoplasme. Après l'étape d'assemblage, les virions nouvellement formés sont sécrétés selon deux mécanismes qui semblent type cellulaire-dépendants : par bourgeonnement de la membrane plasmique (cellules T) ou via l'exocytose de corps multivésiculaires intracellulaires (macrophages) (Didigu & Doms, 2012).

Les tétraspanines interviennent à plusieurs étapes du cycle viral du VIH. Concernant l'entrée, des LEL recombinantes de diverses tétraspanines (CD9, CD63, CD81 et CD151) sont capables de bloquer l'entrée du VIH dans les macrophages (Ho *et al.*, 2006). Récemment, une équipe a cherché à préciser le rôle de CD63 au cours de l'infection par le VIH et les auteurs ont montré que ce n'est pas l'étape d'entrée qui implique CD63, mais plutôt une étape précoce des événements post-entrée, telle que l'initiation de la transcription inverse du génome viral (Chen *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2011). A la surface cellulaire lors de l'infection, la dimérisation de CD4 est nécessaire à la réplication du virus (Bourgeois *et al.*, 2006) et il a été rapporté que ces dimères interagissent avec CD81, suggérant que la dimérisation du récepteur puisse avoir lieu dans des zones enrichies en tétraspanines et distinctes des radeaux lipidiques (Fournier *et al.*, 2010). Enfin, quelque soit la cellule infectée, plusieurs travaux montrent que le virus s'accumule à l'intérieur de la cellule dans des vésicules riches en tétraspanines (Deneka *et al.*, 2007; Garcia *et al.*, 2008).

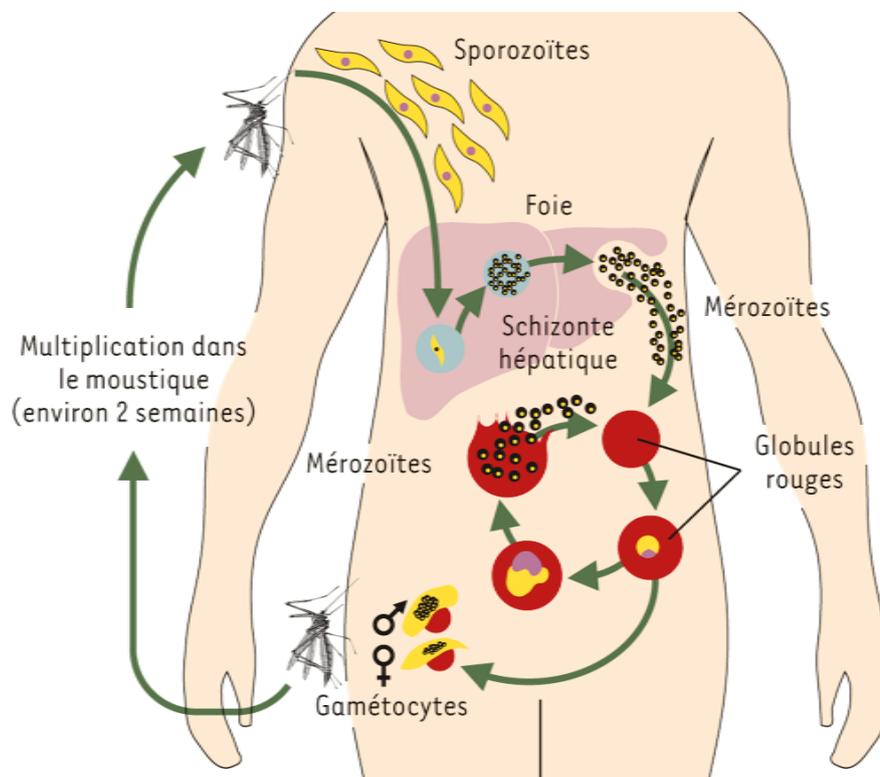
L'évidence la plus marquante du rôle des tétraspanines au cours du cycle du VIH réside probablement dans l'observation du processus de libération des virions néoformés. En effet, il semble que les TEM soient utilisés lors de l'assemblage, le bourgeonnement, mais également la transmission de cellule à cellule du virus (Jolly & Sattentau, 2007). Tout d'abord, le VIH incorpore dans son enveloppe un certain nombre de composants cellulaires, dont les tétraspanines CD9, CD63, CD81 et CD82 (Chertova *et al.*, 2006; Sato *et al.*, 2008), ce qui suggère que le bourgeonnement ait lieu au niveau de zones enrichies en tétraspanines à la membrane plasmique. Aussi, les tétraspanines sont recrutées au niveau des synapses virologiques, ces zones de contact entre une cellule infectée donneuse et une cellule non infectée réceptrice. D'ailleurs, il a été montré que

les tétraspanines jouent un rôle important lors de la transmission du virus de cellule à cellule, notamment en tant que répresseurs de la fusion des deux cellules (Gordón-Alonso *et al.*, 2012; 2006; Kremontsov *et al.*, 2009; Weng *et al.*, 2009). L'assemblage des particules virales semble avoir lieu au niveau des TEM puisque, entre autre, la protéine de capsid Gag du virus colocalise avec des tétraspanines (Nydegger *et al.*, 2006). De manière intéressante, une étude récente à chercher à savoir si le virus utilise des microdomaines préformés lors de son assemblage ou si ce processus induit la formation de ces zones spécifiques riches en tétraspanines (Kremontsov *et al.*, 2010). Pour répondre à cette question, les auteurs ont étudié la dynamique membranaire de CD9 dans le contexte de la multimérisation de Gag. Il apparaît que la tétraspanine CD9 est recrutée aux sites d'assemblage du VIH dépendamment de la multimérisation de Gag. La colocalisation entre CD9 et Gag augmente au cours du temps, c'est-à-dire au fur et à mesure que l'assemblage s'établit. A partir de là, diverses expériences de microscopie à haute résolution ont été réalisées afin de comprendre le processus dynamique menant à cette observation. Des études de FRAP et de SMT ont ainsi révélé que Gag induit un ralentissement de la dynamique de CD9 en corrélation avec une augmentation de son confinement, ce qui indique que CD9 est piégée au site d'assemblage. L'ensemble de ces résultats a permis aux auteurs de proposer que l'assemblage du VIH n'ait pas lieu au niveau de microdomaines pré-existants, mais plutôt que les composants viraux induisent la mise en place de ces plateformes d'assemblage utilisées par le virus.

### ❖ *Les tétraspanines et Plasmodium*

Les parasites du genre *Plasmodium* sont des protozoaires dont le cycle inclut deux hôtes : un moustique femelle du genre *Anopheles* et un hôte vertébré. La principale espèce pathogène pour l'Homme est *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*), responsable du paludisme. Chez l'hôte vertébré, l'invasion par *Plasmodium* requiert deux étapes successives. Tout d'abord, le parasite au stade sporozoïte infecte les hépatocytes puis, dans un deuxième temps, le stade mérozoïte infecte les érythrocytes (globules rouges) (**Figure 28**). Plus précisément, les sporozoïtes sont les formes parasitaires transmises par le moustique lors d'une pique. Une fois dans le sang, ces parasites gagnent le foie et infectent les hépatocytes via la formation d'une vacuole parasitophore. Le sporozoïte est également capable *in vitro* et *in vivo* de pénétrer dans

des hépatocytes par effraction membranaire, ce qui lui permet de migrer à travers plusieurs cellules avant d'infecter un hépatocyte par formation d'une vacuole (Mota *et al.*, 2001). Dans les hépatocytes, le parasite se différencie en schizontes hépatiques en quelques jours. Ces schizontes libèrent ensuite dans la circulation sanguine des milliers de mérozoïtes qui vont infecter les érythrocytes, s'y multiplier et pouvoir ainsi infecter de nouveaux érythrocytes. C'est cette phase de multiplication érythrocytaire qui est responsable des symptômes. Les schizontes peuvent également se différencier en gamétocytes. Ces formes sexuées peuvent ensuite être ingérées par un moustique, au sein duquel aura lieu la multiplication sexuée qui aboutit à la formation des sporozoïtes transmissibles à un nouvel hôte vertébré.



**Figure 28 :** Le cycle de vie de *Plasmodium falciparum* (d'après Silvie *et al.*, 2003)

En 2003, Silvie et collaborateurs ont pour la première fois montré que la présence de la tétraspanine CD81 à la surface des hépatocytes est nécessaire à l'infection par *P. falciparum* chez l'Homme et *P. Yoelii* chez la souris (Silvie *et al.*, 2003). En effet, contrairement à des souris exprimant CD81, des souris dépourvues de CD81 sont résistantes à l'infection par *P. Yoelii*. Ce blocage de l'infection est spécifique à CD81

puisque des souris déficientes en CD9 sont, à l'inverse, infectables par le parasite. En montrant la susceptibilité de souris CD81-/- à l'inoculation avec des érythrocytes infectés, les auteurs ont également montré que CD81 n'est impliquée qu'au cours de la phase hépatique. *In vitro*, cette étude rapporte également que des anticorps anti-CD81, mais pas anti-CD9, bloquent l'invasion de cellules hépatiques murines par *P. Yoelii* lorsque les anticorps sont ajoutés avant ou pendant l'infection. La dépendance à CD81 lors de l'invasion par les sporozoïtes n'est observée que dans le cas de la voie d'entrée avec formation de la vacuole parasitophore, CD81 n'étant donc pas impliquée dans l'entrée par effraction membranaire évoquée précédemment. Le rôle de CD81 lors de l'infection par *P. Yoelii* a aussi été testé dans le contexte de la lignée hépatique murine Hepa1-6 et il a été montré que des anti-CD81 ou des siRNA dirigés contre CD81 bloquent l'entrée des sporozoïtes (Silvie *et al.*, 2006a, b). Concernant *P. falciparum*, des expériences d'ARN interférence contre CD81 ou d'inhibition par des anticorps ont démontré que CD81 est également nécessaire à l'infection d'hépatocytes primaires humain par ce parasite (Silvie *et al.*, 2003).

L'infection d'hépatocytes murins ou humains avec *P. Yoelii* ou *P. falciparum* révèle que *P. Yoelii* est capable d'infecter les cellules humaines, alors que *P. falciparum* n'infecte pas les cellules murines (Silvie *et al.*, 2006b). Egalement, les cellules HepG2 sont résistantes à l'infection par ces deux parasites mais l'expression de CD81 dans ces cellules suffit à les rendre permissive à l'infection par *P. Yoelii* mais pas par *P. Falciparum*, ce qui suggère que d'autres facteurs entrent en jeu pour l'infection par ce dernier (Silvie *et al.*, 2006b).

Un autre parasite du genre Plasmodium est *P. berghei*. Il s'agit d'un parasite de rongeur qui présente la particularité d'infecter les cellules HepG2 aussi bien que les HepG2-CD81. En effet, il a été montré que, dépendamment du type cellulaire, les sporozoïtes de ce parasite peuvent pénétrer dans les cellules à la fois dépendamment et indépendamment de CD81 (Silvie *et al.*, 2003; 2006a; 2007; Yalaoui *et al.*, 2008a).

L'entrée des sporozoïtes dans les hépatocytes requiert plusieurs étapes dont l'attachement du parasite à la cellule, son internalisation, la formation puis l'individualisation de la vacuole parasitophore. L'étape à laquelle CD81 intervient au cours de la pénétration du parasite est inconnue. Egalement, aucune preuve de l'interaction directe entre CD81 et le sporozoïte n'a été décrite. De plus, des formes solubles des LEL de CD81 d'origine humaine ou murine ne bloquent pas l'infection par

*P. falciparum* et *P. yoelii* (Silvie *et al.*, 2003). Une autre évidence de cela provient d'une étude des résidus de CD81 déterminants pour l'infection par *Plasmodium* (Yalaoui *et al.*, 2008b). Les auteurs ont montré qu'une chimère contenant 21 acides aminés provenant de la LEL CD81 dans le contexte du CD9 restaure l'entrée du parasite. Des expériences de mutagénèse dirigée leur ont permis d'affiner ce résultat et de proposer que le résidu en position 137 de la LEL de CD81 ainsi que les acides aminés l'encadrant sont cruciaux pour le rôle de CD81 dans l'infection. Or, un anticorps dont la reconnaissance dépend de la présence de cette région n'est pas capable d'empêcher la pénétration des parasites dans les hépatocytes. L'ensemble de ces résultats suggère donc que CD81 n'est pas un récepteur proprement dit de *Plasmodium*, mais agit plutôt de manière indirecte lors de l'infection (Silvie *et al.*, 2003; Yalaoui *et al.*, 2008b). Toutefois, l'importance du niveau d'expression de CD81 à la surface des cellules pour l'infection par *Plasmodium* a été confirmée. En effet, l'inhibition de l'infection observée après la déplétion des cellules en SRB1 par Yalaoui et collaborateurs est corrélée, au moins partiellement, à une baisse de l'expression de CD81 en surface (Yalaoui *et al.*, 2008a).

En 2006, deux anticorps ciblant le mCD81 de manière dépendante de sa compartimentation membranaire ont été générés (Silvie *et al.*, 2006a). Le premier, le MT81, reconnaît l'ensemble des molécules de mCD81 tandis que le deuxième, le MT81<sub>w</sub>, reconnaît le mCD81 associé à d'autres tétraspanines. Grâce à ces outils, le rôle du mCD81 associé aux TEM a pu être étudié et les résultats obtenus sont en faveur de l'utilisation du CD81 associé aux TEM par *Plasmodium*. Notamment, il a été montré que le MT81<sub>w</sub> bloque 70% de l'infection par *P. yoelii* dans les cellules Hepa1-6. Aussi, les auteurs ont rapporté que la MβCD diminue la reconnaissance par le MT81<sub>w</sub>, mais également l'infection par *P. falciparum* et *P. yoelii* d'hépatocytes humains et murins respectivement. Un lien étroit semble exister entre la teneur en cholestérol de la membrane et CD81 puisque, dans le cas de l'infection par *P. berghei*, la MβCD inhibe uniquement la voie d'entrée CD81-dépendante (Silvie *et al.*, 2006a; 2007).

Enfin, une étude rapporte que EWI-F/CD9P-1, un partenaire de CD81, peut influencer l'infection par *P. yoelii* (Charrin *et al.*, 2009a). En effet, la surexpression de EWI-F dans les cellules Hepa1-6 inhibe l'infection par *P. yoelii* tandis que la réduction de son expression par ARN interférence dans les Hepa1-6 et les HepG2-CD81 augmente l'infection. En parallèle, l'effet d'EWI-2, un autre partenaire majeur de CD81, a été testé et les résultats indiquent que seul EWI-F est capable de moduler l'entrée des sporozoïtes

dans les cellules. Dans ce travail, les auteurs ont montré aussi que l'effet inhibiteur exercé par EWI-F est dépendant de son interaction avec CD81 et indépendant d'un éventuel lien avec des protéines intracellulaires. De plus, EWI-F n'abolit pas l'infection CD81-indépendante de *P. berghei* ce qui confirme que cette protéine influence les fonctions de CD81. La reconnaissance par le MT81w est inchangée en présence ou en absence de EWI-F, ce qui suggère que cette protéine ne modifie pas la répartition membranaire de CD81. Une hypothèse majeure quant à l'effet inhibiteur de ce partenaire repose sur la formation d'un complexe entre CD81, EWI-F et une ou plusieurs molécules non encore identifiées dont les fonctions pourraient être altérées en présence d'EWI-F.

## **E. Influence des TEM et des protéines EWI sur l'entrée du VHC**

### **1. Le rôle des TEM dans l'entrée**

#### **a) Les lipides et l'entrée du VHC**

Les lipides jouent un rôle majeur dans l'organisation des membranes cellulaires et peuvent influencer les processus infectieux, comme vu précédemment pour l'entrée du parasite *Plasmodium* (**Partie I.D.4.b**). Concernant l'infection par le VHC, il a été montré que le cholestérol influence notamment l'étape d'entrée (Kapadia *et al.*, 2007; Lavillette *et al.*, 2006; Rocha-Perugini *et al.*, 2009). En effet, afin d'étudier le rôle de ce lipide, plusieurs équipes ont utilisé la M $\beta$ CD (Kapadia *et al.*, 2007; Rocha-Perugini *et al.*, 2009). Ainsi, il a été montré que ce traitement inhibe l'infection par le VHC, en diminuant l'expression de CD81 à la surface cellulaire. La restauration des niveaux de cholestérol membranaire permet d'ailleurs de restaurer, totalement ou partiellement en fonction des études, le niveau d'expression de CD81 et l'infection par le VHC. Le contenu de la membrane en sphingolipides module également l'infection virale. En effet la Smase, une drogue qui convertit les sphingomyélines en céramides, inhibe l'entrée du VHC dans les cellules en induisant l'internalisation de CD81, diminuant ainsi sa présence à la surface des cellules (Rocha-Perugini *et al.*, 2009; Voisset *et al.*, 2008).

#### **b) Les TEM et l'entrée du VHC**

CD81 est donc une tétraspanine qui, en tant que telle, interagit avec des protéines partenaires ainsi que d'autres tétraspanines au sein de microdomaines particuliers de la membrane et enrichis en lipides : les TEM. Dans une étude du laboratoire, à laquelle j'ai participé, le rôle joué par les molécules de CD81 associées aux TEM a été analysé ((Rocha-Perugini *et al.*, 2009) **voir Annexe n°1**). Dans ce but, une lignée cellulaire Huh-7w7 (n'exprimant plus de manière endogène hCD81) exprimant mCD81 (Huh-7w7/mCD81) a été générée. En comparaison aux cellules Huh-7 classiques, l'infection peut être restaurée à hauteur d'environ 30% dans ces cellules. Grâce à cet outil cellulaire, les anticorps anti-mCD81 décrits par Silvie et collaborateurs ont pu être utilisés afin d'étudier spécifiquement le rôle des molécules de CD81 associées aux TEM dans l'entrée virale. Comme déjà évoqué (**Partie I.D.4.b**), le MT81 et le MT81w

reconnaissent différemment le mCD81 s'il est associé ou non à d'autres tétraspanines (Silvie *et al.*, 2006a). En effet, des expériences d'immunoprécipitation dans différentes conditions de détergent ainsi que de déplétion en CD9 ont permis à Silvie et collaborateurs de montrer que le MT81 reconnaît la population totale de mCD81 tandis que le MT81 $\underline{w}$  semble ne reconnaître que le mCD81 engagé dans des interactions tétraspanine-tétraspanine. Il est à noter que de tels outils n'existent pas dans le contexte du CD81 d'origine humaine. Tirant profit de ces anticorps et de la lignée Huh-7w7/mCD81, le laboratoire a montré que les molécules de CD81 associées aux TEM ne sont pas utilisées de manière préférentielle par le VHC (Rocha-Perugini *et al.*, 2009). Des expériences de neutralisation de l'infection par des VHC $\underline{pp}$  et VHC $\underline{cc}$  avec les anticorps anti-mCD81 ont montré que le MT81 neutralise l'infection avec une efficacité considérablement plus forte que le MT81 $\underline{w}$ , qui inhibe à peine 50% de l'infection même à très grande concentration. Aussi, comme évoqué précédemment, la M $\beta$ CD et la Smase diminuent l'infection par le VHC notamment en diminuant l'expression de CD81 en surface. Des expériences de cytométrie en flux ont montré que la reconnaissance par le MT81 est considérablement diminuée par ces deux drogues, ce qui corrèlent avec les observations faites dans d'autres études (Kapadia *et al.*, 2007; Voisset *et al.*, 2008). Au contraire, le marquage par l'anticorps MT81 $\underline{w}$  est inchangé en présence de M $\beta$ CD et il est même augmenté lors d'un traitement par la Smase. Ce résultat, associé aux autres expériences, indique donc que le VHC n'utilise pas le CD81 associé aux TEM pour entrer dans ses cellules cibles (Rocha-Perugini *et al.*, 2009).

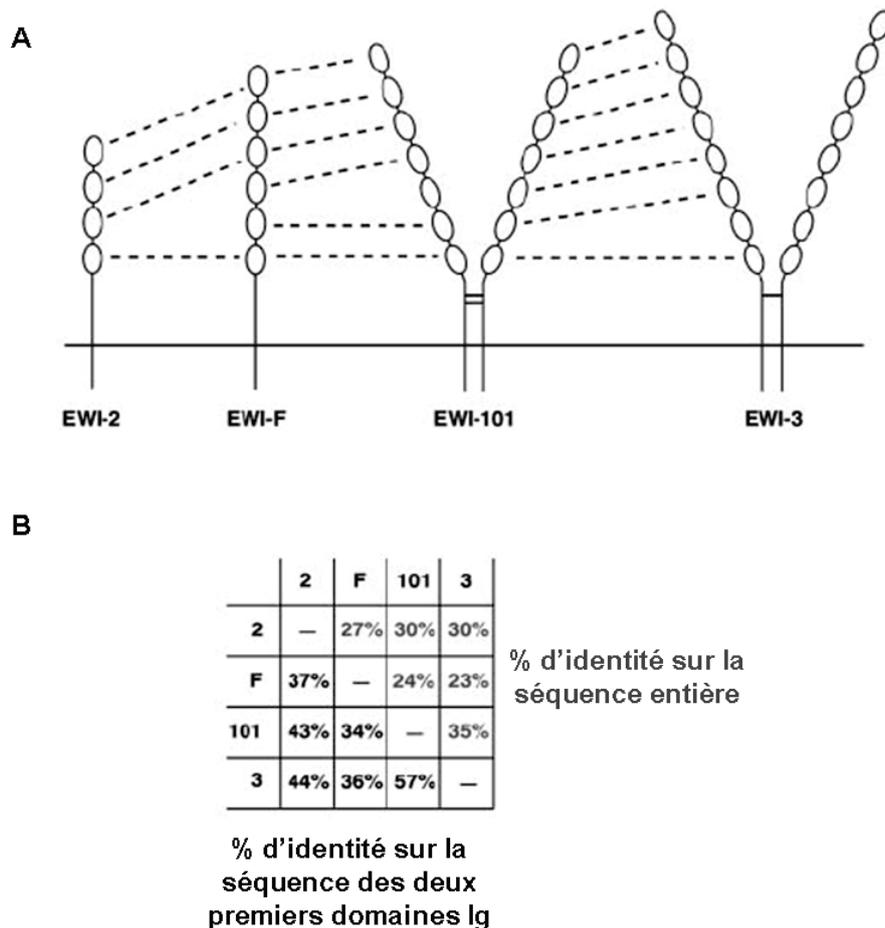
## 2. Les protéines EWI

### a) Les protéines EWI et les tétraspanines

EWI-2 (encore appelée PGRL, IGSF8 ou CD316) appartient, avec les protéines EWI-F (encore appelée CD9P-1, FPRP ou CD315), EWI-101 (encore appelée CD101 ou V7) et EWI-3 (encore appelée IgSF3) à la famille des protéines EWI, classée dans la superfamille des Ig (**Figure 29**) (Clark *et al.*, 2001; Stipp *et al.*, 2001a). Toutes les quatre se situent sur le chromosome humain 1 (Stipp *et al.*, 2001a; Zhang *et al.*, 2003). La grande homologie de séquence et leur localisation génomique adjacente suggère une évolution à partir d'un ancêtre commun, par duplication génique (Zhang *et al.*, 2003). Les protéines EWI présentent en effet une grande similarité de séquence, entre 23 et

35%, les deux premiers domaines Ig étant les plus proches avec une similarité de 24 à 57% (**Figure 29**). EWI-3 et EWI-101 sont plus proches entre elles, comme le sont EWI-2 et EWI-F (Stipp *et al.*, 2001a).

La caractéristique principale de ces protéines est la présence d'un motif Glu-Trp-Ile (EWI) présent dans leur domaine extracellulaire. En plus de cette caractéristique, les ectodomains de toutes les protéines EWI sont composés exclusivement de domaines Ig de type V, ce qui est rare dans la famille des Ig en général (Stipp *et al.*, 2001a; Zhang *et al.*, 2003). Ces protéines présentent un large domaine extracellulaire, un segment transmembranaire et une queue cytoplasmique courte et hautement chargée. De plus, les deux domaines Ig les plus distaux des protéines EWI sont les régions présentant le plus d'homologie avec les autres protéines de la superfamille des Ig (Stipp *et al.*, 2001a).



**Figure 29:** Les protéines de la famille EWI (d'après Stipp *et al.*, 2001)

- A)** Les domaines Ig les plus proches sont indiqués par des lignes pointillées.  
**B)** Les relations des protéines de cette famille ont été mesurées par le calcul du pourcentage d'identité sur l'alignement de la séquence entière (en gris) ou sur les deux premiers domaines Ig (en noir).

Comme déjà évoqué précédemment, deux partenaires majeurs de CD81 et CD9 sont EWI-F et EWI-2, deux protéines de la famille EWI (Charrin *et al.*, 2003a; Clark *et al.*, 2001; Stipp *et al.*, 2001a). EWI-F possède six domaines Ig extracellulaire pour un poids moléculaire d'environ 120 kDa. Quant à EWI-2, sa partie extracellulaire est composée de quatre domaines Ig numérotés de 1 à 4, l'Ig 1 étant le domaine le plus distal. Cette protéine fait environ 70 kDa et est glycosylée au niveau des Ig1, 3 et 4 (**Figures 29 et 30**).

EWI-2 et EWI-F sont les seules protéines de la famille EWI qui interagissent avec les tétraspanines CD9 et CD81 (Charrin *et al.*, 2001; Stipp *et al.*, 2001a, b; Charrin *et al.*, 2003a; Clark *et al.*, 2001). Aucune interaction entre EWI-F et CD82 n'a été décrite (Charrin *et al.*, 2001) et l'interaction entre EWI-2 et CD82 est controversée. En effet, alors que Zhang et collaborateurs rapporte une telle interaction dans la lignée lymphocytaire Jurkat, deux autres études ne présentent aucune interaction entre ces deux protéines de surface dans d'autres lignées cellulaires (Charrin *et al.*, 2003a; Montpellier *et al.*, 2011). Comme EWI-2 interagit avec CD81, il est possible que l'interaction observée dans l'étude de Zhang soit médiée par CD81. Egalement, l'influence du type cellulaire et des détergents utilisés ne peut pas être exclue.

Etant donné le rôle central d'EWI-2 dans mon travail de thèse, les paragraphes suivants vont principalement consister en la description de l'expression, la localisation et les fonctions de cette protéine.

### **b) Expression tissulaire et localisation subcellulaire des protéines EWI-2 et EWI-F**

Dans un premier temps, l'étude de la distribution tissulaire de EWI-2 a été basée sur la détection de l'ARNm de cette protéine dans différents organes. Ainsi, il a été montré que EWI-2 est exprimée dans de nombreux tissus et particulièrement au niveau des reins, des testicules, du placenta, de cerveau et du foie (Clark *et al.*, 2001; Kolesnikova *et al.*, 2004; Stipp *et al.*, 2001a; Zhang *et al.*, 2003). Aussi, l'utilisation d'anticorps ciblant EWI-2 ont permis de démontrer sa présence dans certaines cellules sanguines, telles que les LB, LT ou les cellules NK (Charrin *et al.*, 2003a; Vidal-Laliena *et al.*, 2005). Egalement, EWI-2 est détectée dans les cellules dendritiques (Kettner *et al.*, 2007; Sala-Valdes *et al.*, 2006).

De manière intéressante, la distribution cellulaire d'EWI-2 dans les cellules de l'immunité est identique à celle de CD81 et ces deux protéines colocalisent dans les hépatocytes humains (Charrin *et al.*, 2003a). Comme EWI-F, EWI-2 est une protéine de la surface cellulaire qui colocalise et interagit avec les protéines intracellulaires Ezrine, Radixine et Moésine (ERM) via la queue cytoplasmique de la protéine EWI et le domaine N-terminal des ERM (Sala-Valdes *et al.*, 2006). Les ERM sont localisées au niveau de structures riches en actine et sont impliquées dans la liaison entre la membrane et le cytosquelette. Dans l'étude de Sala-Valdés et collaborateurs, il apparaît d'ailleurs que les ERM jouent un rôle dans la localisation subcellulaire de EWI-2 (Sala-Valdes *et al.*, 2006). En effet, l'utilisation de dominants négatifs de la Moésine (correspondants au domaine N-terminal de la protéine et donc incapables d'interagir avec le cytosquelette) induisent la délocalisation d'EWI-2 par rapport à la condition sauvage. Cette étude a aussi montré que CD81 peut interagir avec les ERM, via son domaine C-terminal. Etant donné qu'un mutant de EWI-2 tronqué au niveau de la queue cytoplasmique colocalise toujours avec les ERM, il semble que, dans ce contexte, l'interaction entre EWI-2 et les ERM soit médiée par une autre protéine transmembranaire telle que CD81. Enfin, il a été récemment montré que EWI-2 est capable d'interagir avec l' $\alpha$ -actinine, une protéine de liaison à l'actine, dans les LT (Gordón-Alonso *et al.*, 2012). Ces deux études établissent donc un lien étroit entre EWI-2 et le cytosquelette.

EWI-F est également retrouvée dans de nombreux types cellulaires: LB et LT, certaines cellules myéloïdes, kératinocytes, cellules des glandes salivaires, ovocytes, cellules hépatiques ou encore pulmonaires ... (Charrin *et al.*, 2001; 2009a; Guilmain *et al.*, 2011; Runge *et al.*, 2007; Vidal-Laliena *et al.*, 2005). Il est intéressant de noter que cette protéine est surexprimée dans de nombreuses lignées cellulaires cancéreuses (Charrin *et al.*, 2001), ce qui suggère un (des) rôle(s) de EWI-F dans les processus tumoraux. Concernant sa localisation subcellulaire, EWI-F est localisée en intracellulaire au niveau du RE et du trans-Golgi ainsi qu'à la surface cellulaire, souvent en association avec CD9 (Orlicky, 1996; Singethan & Schneider-Schaulies, 2008). Aussi, comme déjà évoqué, EWI-F interagit avec les ERM et constitue un lien entre la membrane et le cytosquelette (Sala-Valdes *et al.*, 2006).

### c) Les fonctions de EWI-2 et EWI-F

Plusieurs études rapportent un rôle de EWI-2 dans la migration cellulaire. En effet, dans plusieurs types cellulaires, il a été montré que la surexpression de cette protéine induit une diminution de la migration sur différents substrats (Kolesnikova *et al.*, 2004; 2009; Stipp *et al.*, 2003a; Zhang *et al.*, 2003). Ces effets de EWI-2 sur la migration des cellules seraient en lien avec sa capacité à interagir à la fois avec les tétraspanines et les intégrines. D'ailleurs, dans plusieurs lignées cellulaires, l'association entre EWI-2 et les intégrines (particulièrement les intégrines  $\alpha3\beta1$  et  $\alpha4\beta1$ ) se fait par l'intermédiaire de tétraspanines (Kolesnikova *et al.*, 2004; Stipp *et al.*, 2003a). Chez les patients atteints de gliome, une tumeur touchant les cellules de soutien du tissu cérébral, la sous-expression de EWI-2 dans les cellules tumorales est corrélée à un mauvais pronostic de survie. En 2009 et à partir de cette observation, Kolesnikova et collaborateurs ont étudié l'effet de la surexpression de EWI-2 non seulement *in vitro* sur des cellules de gliome, mais également *in vivo* via l'injection de ces cellules tumorales chez la souris (Kolesnikova *et al.*, 2009). Ils ont montré *in vivo* que le développement tumoral est inhibé lorsque les cellules surexpriment EWI-2, en corrélation avec l'observation *in vitro* que la surexpression de EWI-2 diminue la migration des cellules. De plus, ils ont démontré que l'augmentation du niveau d'expression de EWI-2 à la surface cellulaire entraîne une réorganisation des tétraspanines et de leurs partenaires, en l'occurrence CD81, CD9 et des métalloprotéases. De ce fait, les auteurs suggèrent que le phénotype anti-tumoral observé *in vitro* et *in vivo* est en lien avec un changement d'organisation des interactions protéiques à la surface des cellules lorsque EWI-2 est surexprimée. Toujours dans le sens d'un rôle de EWI-2 dans la migration cellulaire, un autre travail a rapporté une augmentation de la migration, et également de la polarisation, de cellules lymphoïdes lorsque l'expression de EWI-2 est diminuée par ARN interférence (Sala-Valdes *et al.*, 2006). En parallèle de l'effet sur la migration, les auteurs ont aussi montré une augmentation de la phosphorylation des ERM, ce qui suggère que l'interaction entre EWI-2 et les ERM est impliquée dans la régulation de la migration cellulaire et de la polarisation dans les lymphocytes, en établissant un lien entre la membrane plasmique et le cytosquelette.

EWI-2 a aussi été identifié comme un marqueur précoce de l'activation des cellules dendritiques (Kettner *et al.*, 2007). Dans cette étude, les auteurs montrent également que EWI-2 peut avoir une activité de récepteur, plus spécifiquement en liant

la protéine de choc thermique HspA8. D'ailleurs, l'engagement d'EWI-2 avec la HspA8 ou avec un anticorps anti-EWI-2 module différemment la capacité de présentation d'antigène et la migration des cellules dendritiques : la stimulation d'antigènes est réduite, la migration favorisée. Ainsi, en étant exprimé tôt après l'activation des cellules dendritiques et en interagissant avec la HspA8, EWI-2 pourrait contribuer à la maturation de ces cellules et à la mise en place de la réponse immunitaire adaptative.

Plusieurs équipes ont également étudié le rôle des molécules EWI-2 et EWI-F à la membrane des ovocytes. En 2007, une étude a montré qu'à la surface de ces cellules, EWI-F et EWI-2 forment des complexes avec la tétraspanine CD9 (Runge *et al.*, 2007). De plus, les auteurs proposent que, en lien avec les ERM et le cytosquelette, ces complexes pourraient réguler la morphologie et le fonctionnement des microvilli, structures nécessaires à une fusion efficace entre l'ovocyte et le spermatozoïde. EWI-2 pourrait également avoir un rôle dans l'interaction entre l'ovocyte et le spermatozoïde (Glazar & Evans, 2009; He *et al.*, 2009). Par exemple, une étude a montré que des formes solubles de EWI-2 ont la capacité de se lier à des spermatozoïdes ayant accompli la réaction acrosomique, une étape indispensable à la fusion des membranes (He *et al.*, 2009). Cette même étude a aussi montré que les ovocytes dépourvus de CD9 présentent une réduction drastique du niveau d'expression d'EWI-2 à leur surface. Ainsi, le défaut de fusion observé dans les ovocytes CD9<sup>-/-</sup> pourrait être lié à la sous-expression de EWI-2.

EWI-2 affecte aussi la multimérisation de CD9. En effet, deux études indépendantes, l'une réalisée dans une lignée cellulaire de mélanome humain, l'autre dans des cellules de gliomes, rapportent que la surexpression de EWI-2 provoque une diminution de la reconnaissance par l'anticorps C9BB, un anticorps qui reconnaît préférentiellement les homoclusters de CD9 (Kolesnikova *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2006).

Enfin, très récemment, une étude a décrit un rôle de EWI-2 au sein des synapses immunologiques et virales (Gordón-Alonso *et al.*, 2012). Dans le cadre de la réponse immunitaire, les cellules T interagissent avec les cellules présentatrices d'antigènes et il en résulte la formation de structures polarisées spécifiques appelées synapses immunologiques, qui correspondent aux zones de contact entre les deux cellules. En conditions pathologiques, et notamment lors d'une infection par le VIH, la transmission virale peut se faire directement d'une cellule infectée vers une cellule non infectée, via la formation d'une synapse dite virologique. Dans leur étude, Gordón-Alonso et collaborateurs ont montré qu'une interaction transitoire entre EWI-2 et l' $\alpha$ -actinine

(une protéine liant l'actine) a lieu au sein des cellules T et que la dissociation de cette liaison est nécessaire à la formation des synapses immunologiques et virales. En effet, un réarrangement du cytosquelette est nécessaire à la mise en place de l'architecture de ces deux types de synapses.

Concernant EWI-F, certaines fonctions lui sont attribuées dans le contexte humain. Brièvement, dans l'étude de Yang et collaborateurs, la surexpression de EWI-F de diminuait la reconnaissance de CD9 par l'anticorps C9BB. Cela indique que, comme EWI-2, EWI-F peut influencer la multimérisation d'une tétraspanine dont il est partenaire (Yang *et al.*, 2006). Dans ce même travail, il a été montré qu'une lignée tumorale est moins reconnue par le C9BB. Cela suggère que l'organisation membranaire de CD9 est modifiée, possiblement par des modifications d'interaction avec ses partenaires, ce qui pourrait influencer le phénotype migratoire et morphologique des cellules tumorales. D'ailleurs, une étude récente a rapporté que l'augmentation ou la baisse d'expression de EWI-F dans les cellules HEK-293 influence l'agrégation et la migration cellulaire, dépendamment du substrat (Chambrion & Le Naour, 2010). Par exemple, lorsque les cellules surexpriment EWI-F, la migration est diminuée sur laminine-5 mais favorisée sur collagène-1. Les auteurs ont aussi montré que le segment transmembranaire et la queue cytosolique de EWI-F étaient nécessaires à son rôle dans la migration cellulaire. Enfin, cette étude a mis en évidence l'importance de la compartimentation membranaire des protéines dans la migration cellulaire puisqu'il apparaît que EWI-F influence ce processus lorsqu'il est localisé en dehors des TEM. En effet, la surexpression de CD9 et CD81 en parallèle de EWI-F inverse les effets de ce partenaire sur la migration, en augmentant le nombre d'interactions entre les tétraspanines et EWI-F.

Egalement, EWI-F a été décrite comme un marqueur de surface dans une lignée cellulaire de cancer du sein (Goenaga *et al.*, 2007). Dans un effort d'identification d'antigènes tumoraux spécifiques, les auteurs ont utilisé une bibliothèque d'anticorps présentés sur phages et les ont sélectionnés sur la base d'une internalisation rapide par les cellules. Un anticorps ciblant EWI-F ayant été sélectionné, cette technique a permis de montrer que EWI-F est surexprimée dans ces cellules cancéreuses. Bien que l'engagement de EWI-F par l'anticorps identifié dans cette étude ne présente aucun effet anti-prolifératif, les auteurs suggèrent qu'il pourrait être utilisé pour délivrer

spécifiquement des composés cytotoxiques aux cellules tumorales aux vues de son internalisation très rapide par les cellules.

De manière intéressante, EWI-F a aussi été décrite comme pouvant interférer avec des processus pathologiques. Comme déjà évoqué, Charrin et collaborateurs ont mis en évidence un effet inhibiteur de EWI-F sur l'infection par *Plasmodium* (Charrin *et al.*, 2009a). En effet, sa surexpression ou la réduction de son expression dans les cellules hépatiques murines induisent respectivement une inhibition et une augmentation de l'infection par des sporozoïtes du genre *Plasmodium Yoelii* (**Partie I.D.4.b**). De plus très récemment, une équipe française a généré une forme tronquée de EWI-F correspondant à une portion du domaine extracellulaire proche de la membrane plasmique et appelée GS-168AT2 (Guilmain *et al.*, 2011). Il a été montré, dans des cellules de cancer du poumon, que l'expression de EWI-F est inversement proportionnelle au niveau d'expression de CD9 et corrélée au pouvoir métastatique des cellules. Dans une deuxième étude, ils ont étudié le rôle du GS-168AT2 au cours de l'angiogenèse, un processus de développement des vaisseaux sanguins souvent favorisé dans le contexte tumoral (Colin *et al.*, 2011). Les auteurs ont ainsi montré que cette forme tronquée soluble est capable d'inhiber l'angiogenèse *in vitro*, mais également de bloquer le développement tumoral *in vivo* chez la souris, probablement en diminuant l'expression des tétraspanines CD9 et CD151 à la surface cellulaire.

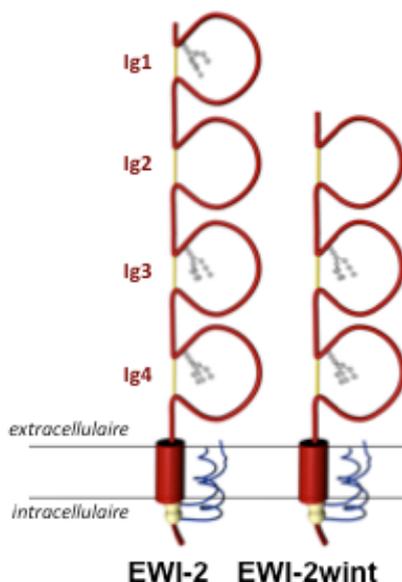
#### d) EWI-2wint

En 2008, le laboratoire a identifié un nouveau partenaire de CD81 : une forme tronquée de la protéine EWI-2, précédemment décrite (Rocha-Perugini *et al.*, 2008). En effet, cette protéine correspond à la séquence d'EWI-2 dépourvue de son premier domaine Ig, à l'extrémité N-terminale de la protéine (**Figure 30**). Pour cela, elle a été nommée EWI-2wint<sup>71</sup>. Le clivage a lieu au niveau d'un site RGR<sup>1</sup>QAP, probablement au niveau du Golgi ou tout au moins dans un compartiment post-RE, car il a lieu après la maturation des N-glycanes (Montpellier *et al.*, 2011). La protéase impliquée dans ce clivage reste non-identifiée à ce jour. Le laboratoire, à l'origine de la découverte de cette protéine, a observé que l'expression directe d'EWI-2wint dans les cellules n'est pas stable. Pour outrepasser ce problème, une stratégie basée sur l'utilisation d'une protéine

---

<sup>71</sup> EWI-2 Without Its N-Terminus

EWI-2 constitutivement clivée, appelée EWI-2<sup>fur</sup> a été développée. En effet, l'ajout d'un résidu arginine au niveau du site de clivage (RGR<sup>1</sup>) permet de reconstituer un site de clivage (RGR<sup>1</sup>) reconnu par l'endoprotéase furine qui est présente dans quasiment toutes les cellules de mammifères. La surexpression de EWI-2<sup>fur</sup> permet ainsi d'exprimer EWI-2 mais également de produire de manière constitutive EWI-2wint. Grâce à cette construction, il a été montré que, contrairement à la surexpression de la protéine parentale, l'expression ectopique d'EWI-2wint bloque l'entrée du VHC dans des cellules naturellement permissives au virus telles que les cellules Huh-7. De manière intéressante, il a été montré que EWI-2wint est présente dans plusieurs lignées cellulaires mais absente dans les cellules d'origine hépatique. Cela indique qu'en plus de la présence de facteurs cellulaires spécifiques, l'hépatotropisme du VHC pourrait être dû à l'absence d'un facteur inhibiteur de l'entrée du virus.



**Figure 30 : Représentation schématique de EWI-2 et EWI-2wint**

EWI-2wint (à **droite**) correspond à la séquence de EWI-2 (à **gauche**) dépourvue du domaine Ig1.

Dans une étude récente du laboratoire à laquelle j'ai participé, les régions de CD81 et EWI-2/EWI-2wint importantes pour leur interaction ont été identifiées ((Montpellier *et al.*, 2011) voir **Annexe n°2**).

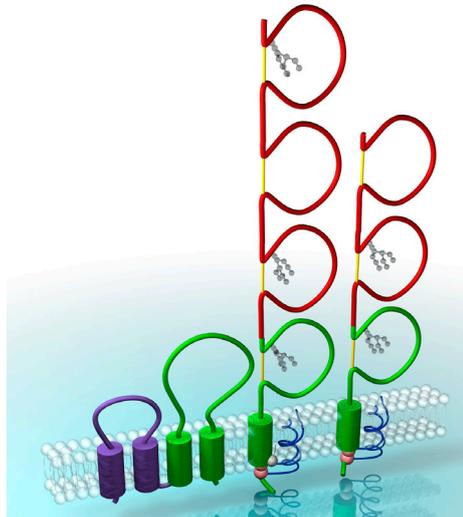
Tout d'abord, concernant, EWI-2/EWI-2wint, différents mutants ont été générés à partir de la construction EWI-2<sup>fur</sup>. Ces mutants ont ensuite été utilisés dans des expériences de co-immunoprécipitation après lyse des cellules dans une solution contenant 1% de Brij97 et 2mM d'EDTA, condition préservant l'interaction entre EWI-

2/EWI-2wint et CD81. Dans un premier temps, les domaines Ig extracellulaires ont été tronqués un par un et il a été observé que le domaine Ig4 est le seul domaine extracellulaire qui soit nécessaire à l'interaction avec CD81. De manière intéressante, l'interaction entre CD9 et EWI-2/EWI-2wint est conservée même lorsque ce domaine est tronqué, ce qui indique que les déterminants de l'interaction entre EWI-2/EWI-2wint et CD81 ou CD9 sont différents. Afin de tester le rôle du TM et de la queue cytosolique de EWI-2/EWI-2wint, des chimères ont été générées. Pour cela, le TM (chimère TM), la queue cytosolique (chimère Q) ou ces deux régions (chimère TMQ) ont été remplacées par les régions correspondantes de la protéine MHC<sup>72</sup> de classe II dans le contexte de la construction EWI-2<sup>fur</sup>. Les résultats de co-immunoprécipitations ont montré que les trois chimères TM, Q et TMQ perdent la capacité à interagir avec CD81, indiquant que le TM et le segment cytoplasmique jouent un rôle dans l'interaction avec CD81. EWI-2/EWI-2wint possède deux cystéines juxtamembranaires au niveau de la queue cytoplasmique et notre étude a montré que ces cystéines sont palmitoylées. Comme déjà évoqué, la palmitoylation joue un rôle important dans les interactions protéine-protéine, c'est pourquoi nous avons cherché à savoir si ces cystéines palmitoylées étaient impliquées dans l'interaction avec CD81. Pour cela, ces deux résidus cystéines du domaine cytoplasmique de la chimère Q ont été restaurés afin de générer la chimère appelée Qcc qui, contrairement à la Q, est palmitoylée. Les co-immunoprécipitations ont montré que la palmitoylation permet de restaurer l'interaction avec CD81. D'ailleurs, les chimères non-palmitoylables de EWI-2/EWI-2wint (TMQ, Q) n'interagissent plus avec CD81 ni avec CD9, ce qui démontre l'importance de cette modification post-traductionnelle dans l'interaction avec les tétraspanines. Un mutant de la construction EWI-2<sup>fur</sup> dans laquelle les deux cystéines juxtamembranaires ont été remplacées par des alanines (EWI-2/EWI-2wint<sup>plm-</sup>) a permis de confirmer cette observation. Au sein du TM de EWI-2/EWI-2wint, un motif glycine zipper (GXXXAXXXG) et un motif simple riche en glycine (AXXXG) sont présents. Ce type de motifs pouvant être impliqué dans les interactions TM-TM, les résidus glycine/alanine ont été remplacés par des leucines dans le motif glycine zipper afin de générer les mutants LAG, GAL ou LAL, et également dans le motif simple (mutant LG). Ainsi, il a été mis en évidence un rôle du motif GXXXAXXXG du TM de EWI-2/EWI-2wint dans l'interaction avec CD81. En effet, alors que le mutant LG garde la capacité à interagir avec CD81, ce n'est pas le cas pour les mutants LAG et

---

<sup>72</sup> *Major Histocompatibility Complex*

GAL et plus encore pour le mutant LAL. En résumé, le domaine Ig4, le motif glycine zipper du TM et la palmitoylation de la queue cytosolique de EWI-2/EWI-2wint sont nécessaires pour l'interaction avec CD81 (**Figure 31**).



**Figure 31:** Les régions de CD81 et EWI-2/EWI-2wint impliquées dans leur interaction

Les régions importantes de CD81 (à gauche) et EWI-2/EWI-2wint (à droite) sont colorées en vert.

Etant donné la mise en évidence de l'importance de la palmitoylation de EWI-2/EWI-2wint dans l'interaction avec CD81, un mutant de palmitoylation de CD81 (CD81<sup>plm-</sup>) a été utilisé dans un test de co-immunoprécipitation. Les résultats ont montré que le mutant CD81<sup>plm-</sup> conserve la capacité à lier EWI-2/EWI-2wint, montrant que la palmitoylation de la tétraspanine n'est pas impliquée dans l'interaction avec ces partenaires. Ensuite, afin de préciser les régions de CD81 importantes pour l'interaction avec EWI-2/EWI-2wint, des chimères ont été générées entre CD81 et CD82, une tétraspanine qui n'interagit pas avec EWI-2/EWI-2wint dans nos conditions. Ainsi, les TM, la SEL ou la LEL de CD81 ont été remplacés par les domaines correspondant de CD82 et l'interaction avec EWI-2/EWI-2wint a été testée. Ces expériences ont montré que le remplacement des TM1 et TM2 de CD81 par ceux de CD82 n'affecte pas sa liaison à EWI-2/EWI-2wint. Concernant la SEL, une diminution de l'interaction a aussi été observée mais il semble que la conformation de cette chimère soit altérée. Un rôle de la SEL de CD81 dans la stabilisation de la LEL a d'ailleurs déjà été décrit (Yalaoui *et al.*, 2008b). Par contre, les résultats ont révélé l'importance des TM3, TM4 et LEL de CD81 pour son interaction avec ces partenaires. Des motifs glycine zipper étant présents dans les TM1, TM2 et TM3 de CD81, des mutations simples ou combinées de ces motifs ont été réalisées afin de vérifier leur implication dans l'interaction avec EWI-2/EWI-2wint. Néanmoins, tous les mutants interagissaient avec EWI-2/EWI-2wint, indiquant que ces

motifs glycine zipper ne jouent pas de rôle dans l'interaction entre CD81 et EWI-2/EWI-2wint. En résumé, les régions importantes de CD81 pour la liaison à EWI-2/EWI-2wint sont les TM3, TM4 et LEL (**Figure 31**).

Dans le but de déterminer si les mutations de EWI-2/EWI-2wint qui influencent l'interaction avec CD81 affectent également la capacité de EWI-2wint à inhiber l'infection, des lignées Huh-7 exprimant de manière stable les différentes constructions EWI-2/EWI-2wint<sup>plm-</sup>, TM, Q, TMQ, Qcc et LAL ont été générées. Ces lignées ont été utilisées dans des expériences d'infections avec des VHCcc. Ainsi, il a été observé que les mutants n'interagissant plus avec CD81 (EWI-2/EWI-2wint<sup>plm-</sup>, TM, Q, TMQ, et LAL) perdent leur pouvoir inhibiteur de l'infection par le VHC. A l'inverse, le mutant Qcc, qui interagit toujours avec CD81, bloque l'infection à un niveau équivalent à la construction EWI-2<sup>fur</sup> sauvage. Il existe donc une corrélation entre la capacité de EWI-2wint à interagir avec CD81 et son rôle inhibiteur de l'infection.

De la même façon, des expériences d'infections ont été effectuées dans des lignées cellulaires Huh-7w7 exprimant de manière stable la protéine CD81 sauvage ou les chimères CD81/CD82 (TM1, TM2, TM3, TM4 ou SEL). La LEL de CD81 jouant un rôle majeur dans la reconnaissance du VHC, la chimère possédant la LEL de CD82 n'a pas été utilisée puisque ce domaine doit nécessairement provenir de CD81 pour médier l'infection. Les résultats ont montré que, de la même façon que l'interaction avec EWI-2/EWI-2wint, la restauration de l'infection est affectée dans le cas des chimères TM3, TM4 et SEL, tandis que les chimères TM1 et TM2 rendent les Huh-7w7 permissives à l'infection par les VHCcc. Cela indique que les TM3 et 4 ainsi que les boucles extracellulaires de CD81 sont essentiels à son activité de récepteur. Egalement, ce résultat montre que l'activité de CD81 en tant que récepteur viral est corrélée à sa capacité à interagir avec ses partenaires. Il a été montré que la protéine EWI-2 n'est pas impliquée lors de l'infection par le VHC (Rocha-Perugini *et al.*, 2008). Toutefois, il est possible que le remplacement de certaines régions de CD81 affecte son interaction avec d'autres partenaires impliqués dans l'entrée virale, comme par exemple CLDN-1.

Au cours de cette étude nous avons donc, entre autre, montré que l'interaction entre EWI-2wint et CD81 est indispensable à l'effet inhibiteur exercé par EWI-2wint. Toutefois, et même si des expériences *in vitro* suggèrent que cet effet inhibiteur soit la conséquence d'un blocage de l'interaction de CD81 avec E2 (Rocha-Perugini *et al.*, 2008), le mécanisme précis responsable de l'inhibition de l'entrée du virus reste inconnu.

## **2) CONTEXTE ET OBJECTIFS DES TRAVAUX**

## Article 1:

### Etude du mécanisme par lequel EWI-2wint bloque l'entrée du VHC

Comme décrit au cours de l'introduction, l'entrée du VHC dans ses cellules cibles est un mécanisme séquentiel et complexe mettant en jeu un grand nombre de molécules virales et cellulaires. La découverte de EWI-2wint, une protéine présente dans de nombreuses lignées cellulaires mais absente dans les lignées d'origine hépatique, a mené au concept selon lequel l'hépatotropisme du VHC serait non seulement lié à la présence de facteurs spécifiques, mais également à l'absence d'un inhibiteur spécifique (Rocha-Perugini *et al.*, 2008). En effet, l'expression ectopique de EWI-2wint dans les cellules Huh-7 bloque l'étape d'entrée du VHC. Dans cette même étude, le laboratoire a proposé, par des expériences *in vitro*, que la présence de EWI-2wint à la surface des cellules pourrait bloquer l'interaction entre la particule virale et CD81. Cependant, afin d'aller plus loin dans la caractérisation de cet inhibiteur naturel de l'entrée du VHC, nous avons cherché à mieux comprendre comment cette molécule peut moduler l'étape de l'entrée virale. Etant donné que nous avons montré que le VHC n'utilise pas les molécules de CD81 associées aux TEM pour pénétrer dans les cellules (Rocha-Perugini *et al.*, 2009), nous avons émis l'hypothèse suivante : *EWI-2wint pourrait moduler la compartimentation membranaire de CD81 à la surface des cellules et favoriser son association avec les TEM, diminuant ainsi le nombre de molécules de CD81 compétentes pour l'entrée du VHC.*

Afin de vérifier cela, deux approches majeures ont été utilisées. Dans un premier temps, nous avons exploité le fait que les cellules **Huh-7w7/CD81m** sont permissives à l'infection (Rocha-Perugini *et al.*, 2009), en association avec l'utilisation des anticorps **MT81 et MT81w** décrits précédemment (Silvie *et al.*, 2006a). Notre deuxième approche a consisté en l'utilisation de la technique du **SMT** afin de tester si la **dynamique membranaire de CD81** est modifiée en présence de EWI-2wint dans les cellules Huh-7. Cette technique permet en effet de mettre en lumière des aspects intéressants de la dynamique tels que les types de trajectoires, les coefficients de diffusion ou encore les temps de confinement des protéines marquées. Pour réaliser ce travail, nous avons collaboré avec le Dr Pierre-Emmanuel Milhiet ainsi que Patrice Rassam du Centre de Biochimie Structurale de Montpellier. Dans cette étude de la dynamique de CD81, nous

avons utilisé deux mutants de EWI-2/EWI-2wint, le Qcc et le LAL, en parallèle de la construction EWI-2<sup>fur</sup> sauvage. De cette façon, nous avons pu tester l'influence de l'interaction avec CD81 et de la queue cytosolique de EWI-2/EWI-2wint sur le comportement de CD81 à la membrane.

Dans ce travail, nous avons également cherché à mieux **caractériser l'anticorps MT81w**. Bien qu'il ait été décrit comme reconnaissant les molécules de CD81 associées aux TEM (et donc à différentes tétraspanines) (Silvie *et al.*, 2006a), un doute persistait dans la communauté scientifique étudiant les tétraspanines quant à l'éventualité qu'il soit un anticorps de faible affinité reconnaissant préférentiellement des homo-oligomères de CD81.

L'importance de **l'interaction entre CD81 et CLDN-1** nous a aussi menés à explorer l'effet d'EWI-2wint sur la colocalisation entre ces deux protéines dans des expériences de microscopie confocale.

Enfin, puisque de plus en plus d'évidences corrélaient avec un rôle majeur de la **transmission virale de cellule à cellule** lors de l'infection par le VHC, nous avons investigué l'effet de EWI-2/EWI-2wint sur cette voie d'entrée.

Le travail concernant ces résultats est actuellement en révision dans *Cellular Microbiology* et est disponible dans la partie 1 des résultats :

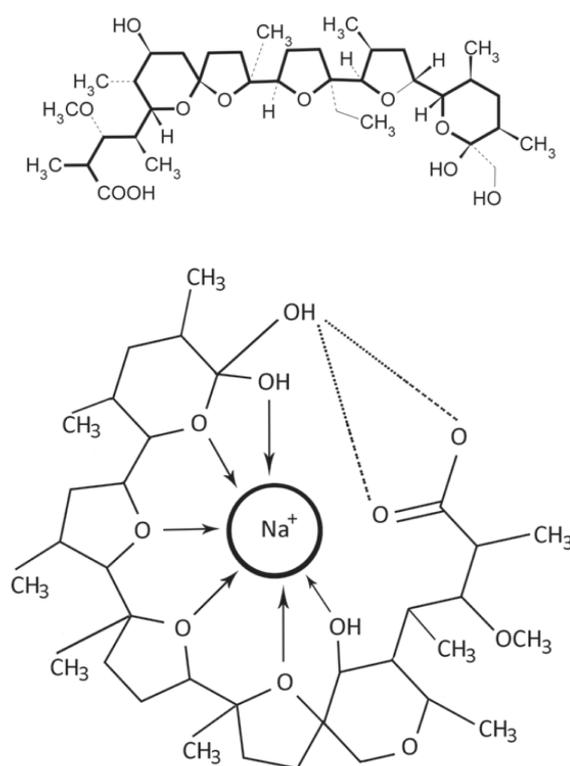
**EWI-2wint promotes CD81 clustering that abrogates Hepatitis C Virus entry.**

Julie Potel, Patrice Rassam, Claire Montpellier, Laura Kaestner, Elisabeth Werkmeister, Birke A. Tews, Cyril Couturier, Costin-Ioan Popescu, Thomas F. Baumert, Eric Rubinstein, Jean Dubuisson, Pierre-Emmanuel Milhiet and Laurence Cocquerel. 2012 *Cellular Microbiology* (en révision).

## Article 2 :

### **Etude de l'effet de la Monensine sur l'infection par le VHC**

La Monensine est un composé isolé à partir de la bactérie *Streptomyces cinnamomensis* qui perturbe la perméabilité membranaire (Haney & Hoehn, 1967). En effet, il s'agit d'un ionophore sélectif responsable de l'échange entre des protons (H<sup>+</sup>) et des cations monovalents (préférentiellement le Na<sup>+</sup>). Ainsi, en traversant les membranes cellulaires, la Monensine provoque un influx de Na<sup>+</sup> dans la cellule induisant un efflux de protons et une augmentation de la concentration intracellulaire en Ca<sup>2+</sup> ayant pour conséquences une augmentation du pH notamment au niveau de l'appareil de Golgi, des endosomes et des lysosomes (Mollenhauer *et al.*, 1990). Sa structure a été décrite en 1967 (Agtarap & Chamberlin, 1967) (**Figure 32**) et à partir de là, ses effets ont été très étudiés.



**Figure 32 : La Monensine**  
(d'après Chapman et al., 2010)

**En haut**, la structure de la Monensine (C<sub>36</sub>H<sub>62</sub>O<sub>11</sub>).

**En bas**, la conformation de la Monensine complexée à un ion Na<sup>+</sup>.

Notamment, en 1982, Maxfield et collaborateurs ont montré qu'une solution de Monensine à 6 $\mu$ M entraîne une augmentation du pH de 5.0 à 6.0 des compartiments endocytiques de fibroblastes murins (Maxfield, 1982). Ils ont rapporté également que l'augmentation de pH est rapide puisque qu'un plateau est atteint après environ deux minutes de traitement, mais aussi réversible en une à deux minutes après lavage des cellules. D'autres études confirment cette observation et notamment dans des cellules hépatocytaires humaines (Tycko *et al.*, 1983). Aussi, l'endocytose et l'exocytose ont été montrées comme altérées lorsque des hépatocytes de rat sont traités par la Monensine (Rustan *et al.*, 1985). De plus, plusieurs travaux ont montré que cette drogue bloque le recyclage de protéines membranaires (Basu *et al.*, 1981; Berg *et al.*, 1983; Harford *et al.*, 1983; Iglesias-Bartolome *et al.*, 2006; Pohlmann *et al.*, 1984; Stein *et al.*, 1984) et la dégradation protéique (Gil-Falgon *et al.*, 1992; Grinde, 1983; Harford *et al.*, 1983; Whittaker *et al.*, 1986). Concernant l'endocytose, il semble que l'étape d'internalisation ne soit pas affectée par la Monensine. Par exemple, il a été montré qu'un tel traitement affecte la sensibilité des cellules à la toxine diphtérique, une exotoxine protéique issue d'une bactérie (Marnell *et al.*, 1982; Muroi *et al.*, 1996). L'effet cytotoxique de cette toxine est en effet bloqué en présence de Monensine et il a été rapporté que cette observation est la conséquence du piégeage de la toxine dans les vésicules endocytiques dont l'acidification est inhibée par la Monensine (Marnell *et al.*, 1982).

La Monensine est très utilisée dans l'industrie agroalimentaire, notamment en tant que complément alimentaire au sein des élevages bovins ou de volailles. Ce composé permet notamment de prévenir les coccidioses ou encore de favoriser la croissance des animaux. Les coccidioses sont des maladies causées par des parasites intracellulaires du genre *Eimeria* et qui touchent différents types d'animaux (bovins, poulets, lapins ...). L'utilisation de la Monensine au sein des élevages est justifiée par plusieurs études rapportant un effet inhibiteur de cette drogue sur l'infection par les parasites *Eimeria* (Chapman *et al.*, 2010). Différents autres pathogènes ont aussi été montrés comme sensibles à cette drogue, et notamment les parasites du genre *Toxoplasma* (Couzinet *et al.*, 2000; Lavine & Arrizabalaga, 2011; 2012), de même que *Plasmodium* et certains virus.

Concernant l'inhibition de l'infection par des virus, de nombreuses études rapportent un effet de la Monensine sur différents virus dont, entre autres, le VIH, le virus simien 40 (SV40<sup>73</sup>), le virus de l'herpès (HSV<sup>74</sup>) et le SVF (Clayson *et al.*, 2003; Dewar *et al.*, 1989; Ghosh-Choudhury *et al.*, 1987; Johnson & Spear, 1982; Marsh *et al.*, 1982). La Monensine peut influencer le cycle de ces virus en différentes étapes. Par exemple, un traitement par la Monensine bloque l'entrée du SVF (Marsh *et al.*, 1982), alors qu'elle altère des phases plus tardives telles que la sécrétion pour d'autres virus comme le HSV ou le SV40 (Clayson *et al.*, 2003; Ghosh-Choudhury *et al.*, 1987).

De manière intéressante, *Plasmodium* est sensible au traitement par la Monensine. Ce composé est capable de bloquer la phase érythrocytaire du cycle de vie du parasite (Adovelande & Schrével, 1996; Gibot *et al.*, 1999; Gumila *et al.*, 1996; 1997), mais également la phase hépatocytaire (Leitao & Rodriguez, 2010; Mahmoudi *et al.*, 2008). Notamment, une étude de prédiction basée sur des comparaisons structurales de composés a récemment permis d'identifier la Monensine comme inhibiteur de l'infection par les sporozoïtes du genre *Plasmodium* (Mahmoudi *et al.*, 2008). Les auteurs ont vérifié *in vitro* cette prédiction et ont montré que la Monensine bloque l'infection d'hépatocytes humains et murins par les sporozoïtes des genres *P. falciparum* et *P. yoelii*, respectivement. Aussi, un autre travail récent confirme cette observation (Leitao & Rodriguez, 2010). En effet, les auteurs ont montré une inhibition *in vitro* de l'infection par les sporozoïtes de *P. yoelii* et *P. berghei* lorsque les cellules Hepa1-6 sont traitées avant et pendant l'infection par une solution contenant de la Monensine à une concentration de l'ordre du nM (Leitao & Rodriguez, 2010). Des expériences complémentaires ont été réalisées afin de préciser l'effet de ce composé au cours de l'infection et les résultats ont indiqué que la Monensine agit plutôt sur la cellule hôte que sur le parasite. En effet, un pré-traitement des cellules avec 10 ou 100 nM de Monensine suivi par des lavages et une incubation avec *P. berghei* entraîne une inhibition de l'infection similaire à celle observée lors d'un traitement pendant toute la durée de l'expérience. Un léger effet sur l'infectivité du parasite est observé lorsque la drogue est incubée avec les sporozoïtes avant l'infection, mais uniquement à la concentration de 1µM. Ensuite, des expériences de cinétique et des tests d'invasion ont révélé que la

---

<sup>73</sup> *Simian Virus 40*

<sup>74</sup> *Herpes Simplex Virus*

Monensine bloque l'étape de l'entrée des parasites dans les cellules. D'ailleurs, contrairement à l'absence de traitement, la Monensine entraîne une diminution drastique de la présence de vacuoles parasitophores dans les cellules. Enfin, dans le but de tester le pouvoir protecteur de la Monensine *in vivo*, les auteurs ont injecté une dose unique de Monensine (10mg/kg) à des souris 1h avant l'infection par *P. berghei*. Ainsi, sur cinq souris traitées dans ces conditions, trois ont été totalement protégées et l'infection des deux autres a été décalée de deux jours, ce qui suggère une parasitémie moindre. Les auteurs ont donc conclu à un rôle inhibiteur de la Monensine sur l'infection par *Plasmodium in vivo*.

Certaines similitudes entre l'infection par le VHC et l'infection par *Plasmodium* ont déjà été démontrées dans l'introduction, comme par exemple le ciblage des cellules hépatiques pour la réplication, le rôle des lipides, l'importance de CD81 et SRB1 dans l'entrée de ces deux pathogènes ou encore le fait que des protéines EWI peuvent interférer avec ce processus. Aux vues de l'effet anti-malarial de la Monensine, nous avons décidé de *tester si la Monensine possède une activité antivirale sur l'infection par le VHC*.

Puisque nous avons observé une diminution de l'infection par le VHC en présence de Monensine, nous avons réaliser différentes expériences afin de préciser **l'étape du cycle viral** bloquée par la Monensine, de tester son effet sur d'**autres virus**, d'étudier son action **en combinaison avec l'IFN** ou encore de définir si elle possède ou non un potentiel inhibiteur sur **la transmission du VHC de cellule à cellule**.

Les résultats de ce travail font l'objet d'un article en préparation présenté dans la partie 2 des résultats :

### **Monensin inhibits a late step of Hepatitis C Virus entry.**

Julie Potel, Catherine François, Noémie Calland, Thibaut Vausselin, Famara Sané, Yves Rouillé, Sandrine Belouzard, Veronique Descamps, Thomas Baumert, Gilles Duverlie, Didier Hober, Jean Dubuisson and Laurence Cocquerel. 2012. En préparation.

### ***3) RESULTATS***

## Article 1 :

EWI-2wint promotes CD81  
clustering that abrogates  
Hepatitis C Virus entry

**Potel, J., Rassam, P., Montpellier, C., Kaestner, L., Werkmeister, E., Tews, B.A., Couturier, C., Popescu, C.I, Baumert, T.F., Rubinstein, E., Dubuisson, J., Milhiet P.E, Cocquerel, L. (2013).** EW1-2wint promotes CD81 clustering that abrogates Hepatitis C Virus entry. *Cellular Microbiology*.

## Article 2 :

Monensin inhibits a late step of  
Hepatitis C Virus entry

## **Monensin inhibits a late step of Hepatitis C Virus entry**

Julie Potel<sup>a</sup>, Catherine François<sup>b</sup>, Noémie Calland<sup>a</sup>, Thibaut Vausselin<sup>a</sup>, Famara Sané<sup>c</sup>, Yves Rouillé<sup>a</sup>, Sandrine Belouzard<sup>a</sup>, Veronique Descamps<sup>b</sup>, Thomas Baumert<sup>d</sup>, Gilles Duverlie<sup>b</sup>, Didier Hober<sup>c</sup>, Jean Dubuisson<sup>a</sup> and Laurence Cocquerel<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Hepatitis C Laboratory, Center for Infection and Immunity of Lille, University Lille Nord de France, CNRS UMR8204, INSERM U1019, Pasteur Institute of Lille, Lille, France

<sup>b</sup> Virology Department, Amiens University Hospital, Amiens, France.

<sup>c</sup> Laboratoire de Virologie EA3610, CHRU, Université Lille 2, Institut Hippocrate, Lille, France.

<sup>d</sup> Inserm-U748, Université de Strasbourg, Pôle Hépatologie-Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France.

\*Correspondence should be addressed to L. C. Center for Infection and Immunity of Lille,

HCV laboratory – IBL - 1, rue du Pr Calmette, BP447, 59021 Lille, France. E-mail:

[laurence.cocquerel@ibl.fr](mailto:laurence.cocquerel@ibl.fr) Phone: +33 3 20 87 11 62 Fax: +33 3 20 87 12 01

Number of words :

## **ABSTRACT**

Three percent of the world's population is chronically infected with hepatitis C virus (HCV) and at risk of developing liver cancer. Although several cell surface proteins have been identified as entry factors for this virus, precise mechanisms regulating HCV entry into hepatic cells are still unknown. In our study, we characterized the effect on the HCV life cycle of Monensin A, an ionophore that raises the intracellular pH. We showed that Monensin inhibits HCV infection in a dose-dependent manner. It is highly effective at nanomolar concentrations. Interestingly, it abrogates cell-to-cell transmission and leads to an additive effect when combined with IFN. We demonstrated that Monensin blocks HCV entry without affecting post-entry steps of HCV life cycle. Furthermore, we found that Monensin likely inhibits the fusion step between viral and cellular membranes, by inducing an alkalinization of intracellular organelles.

## INTRODUCTION

Hepatitis C Virus (HCV) infection is a global public health problem affecting over 130 million individuals worldwide. Its symptoms include chronic hepatitis, liver cirrhosis, and hepatocellular carcinoma (Lemon et al. 2007). No vaccine is available and current antiviral treatment is limited by drug resistance, toxicity and high costs (Tai and Chung, 2009). Very recently, new direct-acting antivirals (DAAs) have been added to the standard-of-care therapy, leading to highly sustained virological response in patients with HCV genotype 1 (reviewed in (Asselah and Marcellin, 2011)). However, due to the high genetic heterogeneity of HCV and its rapid replication, DAAs, which target viral replication, have the propensity to induce the selection of resistant variants. Therefore, combinations of drugs targeting different steps of the viral lifecycle, including virus entry, would likely improve viral response rates and therapeutic success.

HCV is a small enveloped single-strand RNA virus that belongs to the *Hepacivirus* genus in the *Flaviviridae* family (Lindenbach et al. 2007). During the past 15 years, due to the lack of a cell culture system supporting production of infectious virus particles, several surrogate models have been developed to facilitate the analysis of the HCV life cycle. Among these models, pseudoparticles (HCVpp), consisting of native HCV envelope glycoproteins assembled onto retroviral core particles have been useful in investigating HCV entry process (Hsu et al., 2003; Bartosch et al., 2003a). In 2005, production of infectious HCV particles in cell culture (HCVcc) has finally become possible (Lindenbach et al., 2005; Wakita et al., 2005; Zhong et al., 2005). This powerful system is based on the transfection of the human hepatoma cell line Huh-7 with the cloned JFH-1 genome that replicates and produces infectious particles. Although the use of these models have greatly advanced the knowledge of HCV lifecycle, the exact sequence of events leading from HCV-interaction with host factors on the plasma membrane to internalization and viral fusion still remains elusive. After attachment to the target cell, the hepatocyte, a complex process occurs in which the virion interacts with a series of cellular entry factors, including the tetraspanin CD81 (Pileri et al., 1998) and the scavenger receptor type B classe I (SRB1) (Scarselli et al., 2002). After trafficking at the cell surface, the virions are internalized by clathrin-mediated endocytosis (Blanchard et al., 2006; Meertens et al., 2006) and transported to Rab5a positive early endosomes along actin stress fibers, where fusion seems to take place (Meertens et al., 2006; Coller et al., 2009).

Strikingly, HCV shares several common features with another major pathogen, *Plasmodium*, the Malaria agent. Both pathogens selectively infect hepatocytes for replication. They both use liver glycosaminoglycans as docking sites in the liver (Frevort et al., 1993; Germi et al., 2002; Barth et al., 2003), and both critically depend on CD81 and SRB1 to enter hepatocytes (Pileri et al., 1998; Scarselli et al., 2002; Silvie et al., 2003; Bartosch et al., 2003b; Zeisel et al., 2007; Rodrigues et al., 2008; Yalaoui et al., 2008). Finally, HCV and *Plasmodium* entry depend on membrane cholesterol contents (Silvie et al., 2006; Kapadia et al., 2007) and can be inhibited by EWI family members (Rocha-Perugini et al., 2008; Charrin et al., 2009). Interestingly, it has been demonstrated that *Plasmodium* infection could be inhibited by Monensin A, a Na<sup>+</sup> ionophore (Adovelande and Schrével, 1996; Gumila et al., 1996; 1997; Leitao and Rodriguez, 2010; Surolia et al., 2012). This molecule is a well-known polyether antibiotic isolated from *Streptomyces cinnamomensis* (Haney and Hoehn, 1967) for which the structure has been described (Agtarap et al., 1967). It exchanges specifically Na<sup>+</sup> for H<sup>+</sup>, resulting in elevated cytosolic Na<sup>+</sup> concentration and pH (Mollenhauer et al., 1990). Monensin is used extensively in the beef and dairy industries to prevent coccidiosis, enhance growth or prevent bloat (Goodrich et al., 1984; Meinert et al., 1992; Zinn et al., 1994; Haberkorn, 1996). In our study, we evaluated the anti-viral potential of Monensin against HCV infection.

## MATERIALS AND METHODS

**Chemicals and cell culture.** Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), Opti-MEM, phosphate-buffered saline (PBS), Glutamax-I, non-essential amino acids (NEAA), goat and fetal bovine serum (FBS) were from Invitrogen. 4'6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) was purchased from Molecular Probes (Invitrogen). Monensin and Mowiol 3-88 were from Calbiochem. Monensin was resuspended in ethanol at 100mM. Other Chemicals were from Sigma.

Huh-7 and HEp-2 cells were from ATCC. Huh-7-Lunet-CD81-Fluc-BLR cells (Gentzsch et al., 2011) were kindly provided by T. Pietschmann (Twincore, Hanover, Germany). HEp-2 cells were from BioWhittaker.

**Antibodies.** Mouse anti-HCV E1 (A4, (Dubuisson et al., 1994)) and anti-Yellow Fever Virus (YFV) envelope (2D12, ATCC CRL-1689, (Schlesinger et al., 1983)) monoclonal antibodies (mAb) were produced *in vitro* by using a MiniPerm apparatus (Heraeus), as recommended by the manufacturer. The 3/11 (anti-HCV E2) hybridoma was kindly provided by J. McKeating (University of Birmingham, UK). Anti-CD81 (5A6) was kindly provided by S. Levy (Stanford University, USA). Anti-CD151 (TS151) was kindly provided by E. Rubinstein (Inserm, Villejuif, France). Anti-CLDN1 mAb has been previously described (Fofana et al., 2010). Anti-SRB1 was from BD Biosciences Pharmingen. Anti-EGFR (cocktail R19/48) and anti-OCN were from Invitrogen.

**HCVcc infection assays.** HCVcc used in this study were based on the JFH1 strain (Wakita et al., 2005) and contained cell culture-adaptive CS, N6 and A4 mutations (Delgrange et al., 2007; Goueslain et al., 2010).

HCVcc (JFH1/CSN6A4/5'C19Rluc2AUbi) expressing *Renilla* luciferase were produced as described (Delgrange et al., 2007; Rocha-Perugini et al., 2008). HCVcc were added to Huh-7 cells (m.o.i.=1) seeded the day before in 24-well plates and incubated for 2 h at 37°C. The supernatants were then removed and the cells were incubated in DMEM 10% FBS at 37°C. At 24 or 48 h post-infection, *Renilla* luciferase assays were performed as indicated by the manufacturer (Promega).

**HCVpp and infection assays.** HCVpp were produced as described previously (Bartosch et al., 2003a; Op De Beeck et al., 2004) with plasmids kindly provided by B. Bartosch and

F.L. Cosset (INSERM U758, Lyon, France). A plasmid encoding the feline endogenous virus RD114 glycoprotein (Sandrin et al., 2002) was used for the production of RD114pp. Pseudotypes particles were inoculated on Huh-7 cells for 2h at 37°C. At 24 or 48 h post-infection, *Firefly* luciferase assays were performed as indicated by the manufacturer (Promega).

**Other viruses.** We used the YFV strain 17D and a Sindbis virus expressing the *Firefly* luciferase (SinV, Toto1101/Luc, (Bick et al., 2003), kindly provided by M. MacDonald, Rockefeller University, NY, USA). The recombinant adenovirus expressing the GFP (AdV) was produced as described (Goueslain et al., 2010). These viruses were inoculated on Huh-7 cells for 2h at 37°C and cultured for 24h at 37°C. YFV infections were scored by indirect immunofluorescence, SinV and AdV infections were scored by luminometry and flow cytometry, respectively.

The diabetogenic Coxsackievirus B4 (CVB4) E2 strain (provided by Ji-Won Yoon, Julia McFarlane Diabetes Research Center, Calgary, Alberta, Canada) was produced in HEp-2 cells, as described (Chehadeh et al., 2000). CVB4 infections were scored by evaluating the cytopathic effect at 48h post-infection. It has to be noted that no cytotoxicity of HEp-2 cells was induced by Monensin at 0.1µM or 1µM.

**Indirect immunofluorescence microscopy.** Cells grown onto glass coverslips were infected and processed for immunofluorescence detection of viral proteins as previously described (Rocha-Perugini et al., 2008).

**Viability assay.** Huh-7 and Huh-7-Lunet-CD81 cells were grown in 96-well plates and treated with increasing Monensin concentrations diluted in culture medium. The day after, an MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2H-tetrazolium) based viability assay was done as recommended by the manufacturer (CellTiter 96 aqueous nonradioactive cell proliferation assay, Promega).

**Entry assay.** Cells seeded in 24-well plates were infected with JFH1-Luc for 1h at 4°C (attachment/binding period). Virus was removed, cells were washed with serum free medium and incubated again for 1h at 4°C (post-attachment/binding period). Then cells were washed and incubated for 1h at 37°C (endocytosis/fusion period). Finally, cells

were washed and incubated in 10% FBS culture medium for 21h. Infection levels were monitored by measuring luciferase activities.

**HCVcc cell-to-cell transmission assay.** Huh-7 cells were seeded on coverslips and infected with HCVcc for 2h at 37°C. Cells were then washed and cultured for 48h at 37°C in culture medium containing or not the 3/11 mAb (50µg/ml) in presence or in absence of Monensin. Then, cells were fixed with formalin solution (formaldehyde 4%, Sigma), and foci detected using indirect immunofluorescence.

**Replication and secretion assays.** To control replication and secretion levels, Huh-7-Lunet-CD81 cells were electroporated with a JFH1-Rluc RNA deleted for HCV envelope glycoproteins (JFH1-ΔE1E2 RNA) in Opti-MEM using the Gene Pulser apparatus (Bio-Rad). Cells were next seeded in complete medium for 5h at 37h. Finally, increasing concentrations of Monensin were added to the cells. At 24, 48 and 72h post-infection, cells were lysed and tested for replication using a luciferase based assay (Dual Luciferase Assay, Promega). Cell viability was determined by measuring Fluc levels during the Dual luciferase assay.

**Test of infectivity.** To test the ability of cells to produce infectious HCV particles, Huh-7 cells seeded onto 6-wells plates were infected with HCVcc for 2h at 37°C. Then, virus was removed and cells cultured with increasing concentrations of Monensin. Thirty hours later, supernatants were collected and infectivity titers were determined by indirect immunofluorescence.

**Flow cytometry.** For CD81, SRB1, CLDN-1, CD151 and EGFR staining, cells were cultured with or without Monensin, labeled with TS81, Cla1, anti-CLDN-1, TS151 or anti-EGFR antibodies, respectively for 1h at 4°C. Cells were washed and incubated 45 minutes at 4°C with PE-labeled secondary antibodies, rinsed again, and fixed with formalin solution. Labeled cells were analyzed using a BD FACSCalibur cytometer.

**Detection of OCLN.** Huh-7 cells were cultured with or without Monensin, and lysed in PBS containing 1% TX-100 and protease inhibitors (Complete, Roche Applied Science). Twenty-four hours later, non-reducing Laemmli buffer was added and lysates were

resolved by SDS-PAGE, transferred to a nitrocellulose membrane (GE Healthcare) and immunoblotted with anti-OCN antibody followed by peroxidase-conjugated secondary antibody.

**Monensin / Interferon assay.** Huh-7 cells seeded on 24-well plates were incubated for 2h at 37°C in medium containing Monensin (0.04  $\mu$ M), Interferon (1 U/ml) or both. Cells were then infected for 2h at 37°C with HCVcc-Gluc in the presence of the drugs. After infection, cells were incubated again in complete medium supplemented with Monensin, Interferon or both drugs. Twenty-four hours post-infection, cells were lysed and luciferase activities were quantified.

**Acridine orange stainings.** Huh-7 cells seeded on labteck wells were either left untreated or treated for 2h or 24h with medium containing Monensin (0.1 or 1 $\mu$ M) or Bafilomycin A1 (25nM). Cells were then incubated for 20 min at 37°C with complete medium supplemented with 5 $\mu$ g/ml Acridine Orange and stainings were analyzed immediately by confocal microscopy.

## RESULTS

### Monensin inhibits HCV infection

To determine the effect of Monensin on HCV infectivity, we first tested the capacity of JFH1-based *Renilla* luciferase (R-Luc) reporter HCVcc (HCVcc-Luc) (Rocha-Perugini et al., 2008) to infect Huh-7 cells in the presence of increasing amounts of Monensin. As shown in Fig.1A, infection levels decreased in a dose-dependent manner in the presence of Monensin, indicating that Monensin inhibits HCVcc infectivity. Although some toxicity began to be observed at 10  $\mu$ M, the concentrations of 0.1 and 1  $\mu$ M had no toxic effect, as measured by an MTS assay (Fig.1B). We therefore used the 0.1 and 1  $\mu$ M concentrations of Monensin in the further assays. The inhibition of HCV infection in Monensin-treated cells was confirmed with non-recombinant, cell culture adapted JFH-1 viruses (data not shown). However, due to its greater technical ease, HCVcc-Luc was used in the further assays. Importantly, Monensin was active at nanomolar concentrations since the half-maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) was estimated to 25-45 nM (Fig.1C). In addition, the combination of Monensin with IFN, a known HCV inhibitor, led to an additive effect in inhibition of HCV infection (Fig. 1D).

### Monensin abrogates HCV cell-to-cell transmission

In addition to cell-free infection, HCV can also be transmitted via cell-to-cell contact for which the mechanism needs to be elucidated (Timpe et al., 2008; Witteveldt et al., 2009; Brimacombe et al., 2011). Indeed, HCV is transmitted in the presence of monoclonal antibodies (mAbs) or patient-derived antibodies that are able to neutralize virus-free infectivity (Timpe et al., 2008; Brimacombe et al., 2011). Since cell-to-cell transmission has been suggested to be a major route of transmission for HCV (Brimacombe et al., 2011), we next analyzed the effect of Monensin on this process. For this purpose, Huh-7 cells were infected with HCVcc for 2h and then cultured with neutralizing anti-E2 antibody (3/11) in the presence or in absence of Monensin (0.1  $\mu$ M and 1  $\mu$ M). Two days post-infection, foci were visualized by immunofluorescence (Fig.2A) and sizes of foci were measured by counting the number of cells per focus. Our results showed that Monensin at 0.1  $\mu$ M led to a strong reduction of the number of cells per focus (Fig. 2B) whereas Monensin at 1  $\mu$ M totally inhibits HCV transmission (data not shown). Together, these results indicate that Monensin inhibits cell-to-cell transmission of HCV.

### **Monensin inhibits HCV entry**

To define which step of HCV lifecycle is inhibited by Monensin, it was added during 2 hours at different time points before, during, and after inoculation of Huh-7 cells with HCVcc-Luc (Fig.3A, b, c, d), or added full-time after inoculation (Fig.3A,e), as previously described (Goueslain et al., 2010; Calland et al., 2012). Untreated cells (CTL) and cells treated before, during, and after infection (a) were used as controls. The results clearly showed that Monensin significantly inhibits HCVcc infection when present during virus infection (Fig.3A, c). There was no effect of the drug if added as a pretreatment of cells (Fig.3A, b) or post-infection (Fig.3A, d, e). These results indicate that Monensin likely inhibits the entry step of HCV. To confirm this hypothesis, we used in the same experimental conditions retroviral particles pseudotyped with HCV envelope glycoproteins (HCVpp2a) or with the envelope protein of the retrovirus RD114 (RD114pp), as a control (Fig.3B). HCVpp2a infectivity was reduced by 80% when Monensin was present during infection (Fig.3B, c). A slight decrease in HCVpp2a infection was observed in condition b that is likely due to some remaining Monensin acting on the entry step (Fig.3B, b). Similarly, the slight decrease observed in condition d is likely related to Monensin acting on the entry of remaining particles (Fig.3B, d). When cells were incubated full-time with Monensin (Fig.3B, a) or full-time after inoculation of viruses (Fig.3B, e), a significant decrease was measured for both pseudotypes indicating that a post-entry step of pseudoparticle infection was blocked by Monensin. It has to be noted that HCVpp2a infection was more strongly inhibited than that of RD114pp when Monensin was present full-time during infection (Fig.3B, a). Moreover, no inhibition was found when Monensin was added after inoculation of HCVcc (Fig.3A, d and e). Altogether, our results indicate that Monensin inhibits the entry step of HCV.

### **Monensin does not inhibit HCV replication and egress**

Although the above data indicate that Monensin strongly affects HCV entry, we cannot exclude additional effects on other steps of the HCV lifecycle. To analyze the effect of Monensin on HCV genome replication, we used Lunet-CD81 cells, a Huh-7-derived cell clone expressing the *Firefly* luciferase enzyme (F-Luc) thus permitting assessment of cell density and viability which is proportional to the level of FLuc in the cells (Gentsch et al., 2011). Lunet-CD81 cells were electroporated with *in vitro* transcribed assembly-

defective HCVcc- $\Delta$ E1E2-Rluc RNA, to bypass the entry step, and avoid any interference with late steps of HCV lifecycle. Monensin had no effect on HCV replication, even after a long period of treatment (72h post-electroporation) (Fig. 4A).

To determine whether monensin could have any effect on HCV assembly or secretion, Huh-7 cells were infected with HCVcc for 2h and then cultured with 0.1 or 1  $\mu$ M of Monensin. Thirty hours later, supernatants were collected and infectivity titers were determined by indirect immunofluorescence. As shown in Fig.4B, Monensin had no effect on HCVcc infectious titers, indicating that this molecule does not affect egress of HCV.

### **Monensin does not act on viral particles**

Since we showed that Monensin blocks the entry step of HCV, we next wondered whether Monensin would act directly on viral particles. For this purpose, HCVcc were preincubated with 1  $\mu$ M of Monensin before contact with target cells and then diluted to 0.1 $\mu$ M during viral inoculation. In these experimental conditions, if Monensin acts directly on virions, it should have a stronger inhibitory effect on infection than the one observed with the same concentration (1 $\mu$ M) during the inoculation, without preincubation, as described in Fig.3A. Otherwise, no inhibitory effect should be observed because the presence of 0.1 $\mu$ M of Monensin during viral inoculation does not significantly inhibit HCV infection (Fig. 5A, 0.1 CTL and data not shown). As shown in Fig.5A, preincubation of virus with 1 $\mu$ M of Monensin did not significantly affect HCV infection demonstrating that Monensin does not act on HCV particles.

### **Monensin does not affect the expression level of HCV entry factors**

HCV entry is a multistep process involving several cellular attachment and entry factors. After attachment to the host cell, a complex process occurs in which the virion interacts with a series of cellular entry factors, including CD81 (Pileri et al., 1998), SRB1 (Scarselli et al., 2002), two tight junction proteins, claudin-1 (CLDN-1 (Evans et al., 2007)) and occludin (OCLN (Ploss et al., 2009)) and additional host factors (Lupberger et al., 2011; Sainz et al., 2012) including the epidermal growth factor receptor (EGF-R). Therefore, we then determined whether Monensin inhibits HCV entry by modulating the expression level of aforementioned cellular factors. Huh-7 cells were treated with 0.1 $\mu$ M or 1 $\mu$ M of Monensin during 24 hours and entry factors analyzed by flow cytometry or

western blotting. Cell surface expression levels of SRB1, CD81, CLDN-1 and EGF-R, for which antibodies against extracellular domains are available, were analyzed by flow cytometry. In contrast, OCLN, for which no such antibody is available, was analyzed by Western blotting. CD151, another tetraspanin not involved in HCV entry, was used as a control. As shown in Fig.5B, no significant effect of Monensin on the expression levels of HCV entry factors was found, indicating that Monensin does not block HCV entry by affecting its entry factors.

### **Monensin inhibits a late step of HCV entry**

After attachment to cell surface and binding to entry factors, HCV virions are internalized by clathrin-mediated endocytosis (Blanchard et al., 2006; Meertens et al., 2006). Following internalization, HCV is transported to early endosomes along actin stress fibers, where fusion seems to take place (Meertens et al., 2006; Collier et al., 2009). To determine at which step HCV entry is impaired by Monensin, we administered Monensin at different intervals during the early phase of infection. Virus attachment and binding were performed at 4°C (Fig. 6A, Steps 1 and 2), Then, cells were shifted to 37°C to allow endocytosis and fusion (Fig.6A, Step 3). Strikingly, the addition of Monensin during the third step led to a strong inhibition of HCV infection, almost as strong as the one observed when Monensin was present during the three steps. In contrast, no inhibition was observed when Monensin was added during attachment/binding steps. Together, these results indicate that Monensin blocks either the endocytosis or the fusion step of HCV entry.

Next, in order to define its activity spectrum and better understand the mechanism of action of Monensin, we analyzed its antiviral activity against other viruses. We used the Yellow Fever Virus (YFV), another member of the *Flaviviridae* family and the Sindbis virus (SinV), which is unrelated with HCV but is believed to be an enveloped virus that exploits the same entry route than HCV. In addition, we used the human Adenovirus-5 (AdV), a nonenveloped pH-dependent virus which enters cells via clathrin-mediated endocytosis and the Coxsackie Virus B4 (CVB4), a nonenveloped virus for which the entry mechanism is not well defined but believed to be pH-independent involving in part clathrin-mediated endocytosis. For all infections, Monensin at 0.1µM or 1µM was added 2 hours before infection and kept during and after viral inoculation (Fig. 6B). Interestingly, Monensin led to a strong inhibition of YFV infection at both

concentrations, even stronger than the one observed on HCV (Fig. 6B). Moreover, Monensin at 0.1 $\mu$ M barely reduced SinV infection whereas it abrogated SinV infection when used at 1 $\mu$ M. On the other hand, no reduction was observed on AdV and CVB4 infections (Fig. 6B).

Together, these results indicate that (i) Monensin has likely a general effect on *Flaviviridae* viruses or enveloped viruses, (ii) Monensin does not interfere with nonenveloped virus infection regardless of their sensitivity to pH, (iii) Monensin does not substantially affect clathrin-mediated viral endocytosis and (iiii) the antiviral activity of Monensin is likely related to its effect on endosome acidification.

To strengthen this last hypothesis, we analyzed the effect of Monensin on organelle acidification. Acridine Orange (AO) was used to assay for acidic organelles. It is a weakly basic fluorescent probe that emits green at low concentrations. AO accumulates in acidic compartments where it oligomerizes and fluoresces in red. In contrast, alkalization of the endocytic structure with Bafilomycin A1 is accompanied by a change in the AO fluorescence (Yoshimori et al., 1991; Harada et al., 1997). Indeed, as shown in Fig. 7, AO produced a highly punctuated red staining in Huh-7 cells. In contrast, the addition of Bafilomycin A1 for 2 hours or 24 hours led to a drastic decrease of red AO fluorescence. Interestingly, this effect was also observed in Huh-7 cells treated with Monensin at 1 $\mu$ M during 2 or 24 hours, indicating that the treatment of Huh-7 cells with Monensin leads to an alkalization of intracellular organelles. Therefore, the antiviral activity of Monensin is likely related to its effect on organelle acidification. It has to be noted that Huh-7 cells treated with Monensin at 0.1 $\mu$ M during 24h showed an intermediate AO staining, which was likely due to the fact that Monensin is probably no longer effective at this concentration after 24h of incubation, in addition its effect is rapidly reversed (data not shown and (Maxfield, 1982)).

## DISCUSSION

The aim of this study was to characterize the effect on the HCV lifecycle of Monensin A, an ionophore that raises the intracellular pH. We showed that Monensin inhibits HCV infection in a dose-dependent manner. Interestingly, it abrogates cell-to-cell transmission and leads to an additive effect when combined with IFN. We demonstrated that Monensin blocks HCVcc as well as HCVpp entry, without affecting post-entry steps of the HCV lifecycle. Furthermore, we found that Monensin leads to an alkalization of intracellular organelles that affects a late step of entry, probably by inhibiting the fusion step between viral and cellular membranes.

Enveloped viruses enter cells either by direct fusion at the plasma membrane or by receptor-mediated endocytosis. For a large number of retroviruses, penetration into the cytoplasm of the target cell occurs directly at the plasma membrane by a fusion mechanism triggered through the interaction of viral envelope proteins with their cognate receptors. In contrast, for numerous viruses such as Influenza or SinV, following attachment to receptors on the cell surface, the virus-receptor complex is internalized via clathrin-coated pits and delivered to intracellular vesicles of the endosomal compartment. In these vesicles, the acidic environment induces a conformational change in the viral fusogenic envelope glycoproteins, which is believed to expose a hydrophobic domain that interacts with the endosomal membrane. This interaction leads to the fusion between cellular and viral membranes delivering the nucleocapsid into the cytosol. For HCV, it has been demonstrated that virions enter target cells by clathrin-mediated endocytosis (Blanchard et al., 2006) and that fusion occurs in the early endosomes (Meertens et al., 2006). The use of vacuolar acidification inhibitors ((Hsu et al., 2003; Bartosch et al., 2003b; Blanchard et al., 2006; Koutsoudakis et al., 2006; Meertens et al., 2006; Tscherne et al., 2006; Sharma et al., 2011) and this study) showed that HCVcc and HCVpp entry is pH-dependent, indicating that the acidic pH of endosome triggers the fusion machinery likely by inducing conformational changes in E1E2 envelope glycoproteins. However, exposure of cell surface-bound HCV to acidic pH followed by a return to neutral pH does not affect viral infectivity (Meertens et al., 2006; Tscherne et al., 2006). In addition, Tscherne et al. have shown that low-pH-triggered entry of HCVcc requires an incubation at 37°C, indicating that productive HCV entry needs interactions/processes that do not occur at 4°C (Tscherne et al., 2006). These data

indicate that HCV envelope proteins require a priming event, which occurs at 37°C, to become sensitive to low pH. Concurring with this, it has been very recently shown that HCV pretreatment with the large extracellular loop (LEL) of CD81 enhances infectivity, induces conformational changes in E1 and E2, allows E2 binding to liposomes, irreversibly inactivates particles at low pH in the absence of a target membrane, and leads to the fusion with the plasma membrane of permissive cells at acidic pH, indicating that CD81 plays a central role in HCV entry by priming HCV for low pH-dependent conformational changes (Sharma et al., 2011).

In accordance with studies described above, our results show that HCV entry is inhibited by Monensin, a Na<sup>+</sup> ionophore that raises cytosolic Na<sup>+</sup> concentration and pH. Importantly, we demonstrated that Monensin blocks HCV infection with maximal potency when added during the first hour of shift at 37°C, after the 4°C post-attachment/binding step. Almost complete resistance to Monensin was achieved about two hours after infection, indicating that at this time almost all particles have undergone fusion and reached the cytosol. The use of Monensin on infection with viruses from different families indicated that Monensin does not block internalization but rather acts on fusion machinery, likely by inducing an alkalization of intracellular organelles, as demonstrated by acridine orange staining. Importantly, we demonstrated that Monensin blocks the cell-to-cell transmission route of HCV, for which precise mechanisms need to be defined. Our data indicate that cell-free and cell-cell transmission of HCV may share common mechanisms involving a pH-dependent fusion step between cellular and viral membranes.

Up to now, the mechanism mediating HCV fusion has not been elucidated, but it has been suggested that the fusion mechanism occurring for other *Flaviviridae* viruses may apply to HCV. The use of vacuolar acidification inhibitors ((Hsu et al., 2003; Bartosch et al., 2003b; Blanchard et al., 2006; Koutsoudakis et al., 2006; Meertens et al., 2006; Tscherne et al., 2006; Sharma et al., 2011) and this study) showed that HCVcc and HCVpp entry is pH-dependent, thus allowing HCV RNA delivery into cytoplasm, supporting the hypothesis of similar fusion mechanisms between HCV and other *Flaviviridae* viruses. Membrane fusion is the last step of HCV entry process and different fusion assays have been developed to better understand the fusion requirements (Lavillette 2006, Haberstroh 2008, Kobayashi 2006). It will be thus interesting to analyze the effect of Monensin in such assays.

Due to its toxicity in humans (Caldeira et al., 2001; Kouyoumdjian et al., 2001), it will probably not be possible to use Monensin as a new therapeutic treatment against HCV. However, Monensin represents a valuable tool to analyze the late steps of HCV entry i.e. membrane fusion. In addition, it would be interesting to evaluate the antiviral activity of Monensin-derived products, which could have the same antiviral potential without toxicity.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

We thank Sophana Ung and André Pillez for their technical assistance. We are grateful to S. Levy, J. McKeating, E. Rubinstein, T. Pietschmann, M. MacDonald, Ji-Won Yoon, Julia McFarlane for providing us with reagents. We thank the BioImaging Center Lille-Nord de France for access to the instruments. This work was supported by the “Institut Fédératif de Recherche-142” (IFR142) and by a grant from the “Agence Nationale de Recherches sur le Sida et les hépatites virales” ANRS. J.P. and T.V. were supported by a fellowship from the French Ministry of Research. N.C. was supported by a fellowship from ANRS. S.B. was supported by a Marie Curie International Reintegration Grant (PIRG-GA-2009-256300).

## REFERENCES

- Adovelande, J., and Schrével, J. (1996). Carboxylic ionophores in malaria chemotherapy: the effects of monensin and nigericin on *Plasmodium falciparum* in vitro and *Plasmodium vinckei petteri* in vivo. *Life Sci.* 59, PL309–PL315.
- Agtarap, A., Chamberlin, J.W., Pinkerton, M., and Steinrauf, L. (1967). The structure of monensinic acid, a new biologically active compound. *J. Am. Chem. Soc.* 89, 5737–5739.
- Asselah, T., and Marcellin, P. (2011). New direct-acting antivirals' combination for the treatment of chronic hepatitis C. *Liver Int.* 31 Suppl 1, 68–77.
- Barth, H., Schäfer, C., Adah, M.I., Zhang, F., Linhardt, R.J., Toyoda, H., Kinoshita-Toyoda, A., Toida, T., van Kuppeveld, T.H., Depla, E., et al. (2003). Cellular Binding of Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein E2 Requires Cell Surface Heparan Sulfate. *J Biol Chem* 278, 41003–41012.
- Bartosch, B., Dubuisson, J., and Cosset, F.-L. (2003a). Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J. Exp. Med.* 197, 633–642.
- Bartosch, B., Vitelli, A., Granier, C., Goujon, C., Dubuisson, J., Pascale, S., Scarselli, E., Cortese, R., Nicosia, A., and Cosset, F.-L. (2003b). Cell entry of hepatitis C virus requires a set of co-receptors that include the CD81 tetraspanin and the SR-B1 scavenger receptor. *J Biol Chem* 278, 41624–41630.
- Bick, M.J., Carroll, J.-W.N., Gao, G., Goff, S.P., Rice, C.M., and MacDonald, M.R. (2003). Expression of the zinc-finger antiviral protein inhibits alphavirus replication. *J Virol* 77, 11555–11562.
- Blanchard, E., Belouzard, S., Goueslain, L., Wakita, T., Dubuisson, J., Wychowski, C., and Rouille, Y. (2006). Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J Virol* 80, 6964–6972.
- Brimacombe, C.L., Grove, J., Meredith, L.W., Hu, K., Syder, A.J., Flores, M.V., Timpe, J.M., Krieger, S.E., Baumert, T.-F., Tellinghuisen, T.L., et al. (2011). Neutralizing antibody-resistant hepatitis C virus cell-to-cell transmission. *J Virol* 85, 596–605.
- Caldeira, C., Neves, W.S., Cury, P.M., Serrano, P., Baptista, M.A., and Burdmann, E.A. (2001). Rhabdomyolysis, acute renal failure, and death after monensin ingestion. *Am. J. Kidney Dis.* 38, 1108–1112.
- Calland, N., Albecka, A., Belouzard, S., Wychowski, C., Duverlie, G., Descamps, V., Hober, D., Dubuisson, J., Rouille, Y., and Séron, K. (2012). (–)-Epigallocatechin-3-gallate is a new inhibitor of hepatitis C virus entry. *Hepatology* 55, 720–729.
- Charrin, S., Yalaoui, S., Bartosch, B., Cocquerel, L., Franetich, J.-F., Boucheix, C., Mazier, D., Rubinstein, E., and Silvie, O. (2009). The Ig domain protein CD9P-1 down-regulates CD81 ability to support *Plasmodium yoelii* infection. *Journal of Biological Chemistry* 284, 31572–31578.
- Chehadeh, W., Kerr-Conte, J., Pattou, F., Alm, G., Lefebvre, J., Wattré, P., and Hober, D. (2000). Persistent infection of human pancreatic islets by coxsackievirus B is associated with alpha interferon synthesis in beta cells. *J Virol* 74, 10153–10164.
- Coller, K.E., Berger, K.L., Heaton, N.S., Cooper, J.D., Yoon, R., and Randall, G. (2009). RNA interference and single particle tracking analysis of hepatitis C virus endocytosis. *PLoS Pathog* 5, e1000702.

- Delgrange, D., Pillez, A., Castelain, S., Cocquerel, L., Rouille, Y., Dubuisson, J., Wakita, T., Duverlie, G., and Wychowski, C. (2007). Robust production of infectious viral particles in Huh-7 cells by introducing mutations in hepatitis C virus structural proteins. *J Gen Virol* *88*, 2495–2503.
- Dubuisson, J., Hsu, H.H., Cheung, R.C., Greenberg, H.B., Russell, D.G., and Rice, C.M. (1994). Formation and intracellular localization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia and Sindbis viruses. *J Virol* *68*, 6147–6160.
- Evans, M.J., Hahn, von, T., Tscherne, D.M., Syder, A.J., Panis, M., Wölk, B., Hatzioannou, T., McKeating, J.A., Bieniasz, P.D., and Rice, C.M. (2007). Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* *446*, 801–805.
- Fofana, I., Krieger, S.E., Grunert, F., Glauben, S., Xiao, F., Fafi-Kremer, S., Soulier, E., Royer, C., Thumann, C., Mee, C.J., et al. (2010). Monoclonal anti-claudin 1 antibodies prevent hepatitis C virus infection of primary human hepatocytes. *Gastroenterology* *139*, 953–964, 964.e1–e4.
- Frevert, U., Sinnis, P., Cerami, C., Shreffler, W., Takacs, B., and Nussenzweig, V. (1993). Malaria circumsporozoite protein binds to heparan sulfate proteoglycans associated with the surface membrane of hepatocytes. *J. Exp. Med.* *177*, 1287–1298.
- Gentsch, J., Hinkelmann, B., Kaderali, L., Irschik, H., Jansen, R., Sasse, F., Frank, R., and Pietschmann, T. (2011). Hepatitis C virus complete life cycle screen for identification of small molecules with pro- or antiviral activity. *Antiviral Research* *89*, 136–148.
- Germi, R., Crance, J.-M., Garin, D., Guimet, J., Lortat-Jacob, H., Ruigrok, R.W.H., Zarski, J.-P., and Drouet, E. (2002). Cellular glycosaminoglycans and low density lipoprotein receptor are involved in hepatitis C virus adsorption. *J. Med. Virol.* *68*, 206–215.
- Goodrich, R.D., Garrett, J.E., Gast, D.R., Kirick, M.A., Larson, D.A., and Meiske, J.C. (1984). Influence of monensin on the performance of cattle. *J. Anim. Sci.* *58*, 1484–1498.
- Goueslain, L., Alsaleh, K., Horellou, P., Roingeard, P., Descamps, V., Duverlie, G., Ciczora, Y., Wychowski, C., Dubuisson, J., and Rouille, Y. (2010). Identification of GBF1 as a cellular factor required for hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* *84*, 773–787.
- Gumila, C., Ancelin, M.L., Delort, A.M., Jeminet, G., and Vial, H.J. (1997). Characterization of the potent in vitro and in vivo antimalarial activities of ionophore compounds. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* *41*, 523–529.
- Gumila, C., Ancelin, M.L., Jeminet, G., Delort, A.M., Miquel, G., and Vial, H.J. (1996). Differential in vitro activities of ionophore compounds against *Plasmodium falciparum* and mammalian cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* *40*, 602–608.
- Haberkorn, A. (1996). Chemotherapy of human and animal coccidiosis: state and perspectives. *Parasitol. Res.* *82*, 193–199.
- Haney, M.E., and Hoehn, M.M. (1967). Monensin, a new biologically active compound. I. Discovery and isolation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* *7*, 349–352.
- Harada, M., Shakado, S., Sakisaka, S., Tamaki, S., Ohishi, M., Sasatomi, K., Koga, H., Sata, M., and Tanikawa, K. (1997). Bafilomycin A1, a specific inhibitor of V-type H<sup>+</sup>-ATPases, inhibits the acidification of endocytic structures and inhibits horseradish peroxidase uptake in isolated rat sinusoidal endothelial cells. *Liver* *17*, 244–250.
- Hsu, M., Zhang, J., Flint, M., Logvinoff, C., Cheng-Mayer, C., Rice, C.M., and McKeating, J.A. (2003).

Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *Proc Natl Acad Sci USA* *100*, 7271–7276.

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

Koutsoudakis, G., Kaul, A., Steinmann, E., Kallis, S., Lohmann, V., Pietschmann, T., and Bartenschlager, R. (2006). Characterization of the Early Steps of Hepatitis C Virus Infection by Using Luciferase Reporter Viruses. *J Virol* *80*, 5308–5320.

Kouyoumdjian, J.A., Morita, M.P., Sato, A.K., and Pissolatti, A.F. (2001). Fatal rhabdomyolysis after acute sodium monensin (Rumensin) toxicity: case report. *Arq Neuropsiquiatr* *59*, 596–598.

Leitao, R., and Rodriguez, A. (2010). Inhibition of Plasmodium sporozoites infection by targeting the host cell. *Exp. Parasitol.* *126*, 273–277.

Lemon, S.M., Walker, C., Alter, M.J., and Yi, M. Hepatitis C Virus. (2007) In Fields *VIROLOGY*, D.M. Knipe, ed. (Lippincott Williams & Wilkins), pp. 1253–1304.

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

Lindenbach, B.D., Thiel, H.-J., and Rice, C.M. (2007) *Flaviviridae: The Viruses and Their Replication*. In *Virology*, D.M. Knipe, and P.M. Howley, eds. (Lippincott Williams & Wilkins), pp. 1101–1152.

Lupberger, J., Zeisel, M.-B., Xiao, F., Thumann, C., Fofana, I., Zona, L., Davis, C., Mee, C.J., Turek, M., Gorke, S., et al. (2011). EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy. *Nat Med* *17*, 589–595.

Maxfield, F.R. (1982). Weak bases and ionophores rapidly and reversibly raise the pH of endocytic vesicles in cultured mouse fibroblasts. *J Cell Biol* *95*, 676–681.

Meertens, L., Bertaux, C., and Dragic, T. (2006). Hepatitis C virus entry requires a critical postinternalization step and delivery to early endosomes via clathrin-coated vesicles. *J Virol* *80*, 11571–11578.

Meinert, R.A., Yang, C.M., Heinrichs, A.J., and Varga, G.A. (1992). Effect of monensin on growth, reproductive performance, and estimated body composition in Holstein heifers. *J. Dairy Sci.* *75*, 257–261.

Mollenhauer, H.H., Morré, D.J., and Rowe, L.D. (1990). Alteration of intracellular traffic by monensin; mechanism, specificity and relationship to toxicity. *Biochim Biophys Acta* *1031*, 225–246.

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

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

Ploss, A., Evans, M.J., Gaysinskaya, V.A., Panis, M., You, H., De Jong, Y.P., and Rice, C.M. (2009).

Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature* 457, 882–886.

Rocha-Perugini, V., Montpellier, C., Delgrange, D., Wychowski, C., Helle, F., Pillez, A., Drobecq, H., Le Naour, F., Charrin, S., Levy, S., et al. (2008). The CD81 partner EWI-2wint inhibits hepatitis C virus entry. *PLoS ONE* 3, e1866.

Rodrigues, C.D., Hannus, M., Prudêncio, M., Martin, C., Gonçalves, L.A., Portugal, S., Epiphonio, S., Akinc, A., Hadwiger, P., Jahn-Hofmann, K., et al. (2008). Host Scavenger Receptor SR-BI Plays a Dual Role in the Establishment of Malaria Parasite Liver Infection. *Cell Host & Microbe* 4, 271–282.

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

Sandrin, V., Boson, B., Salmon, P., Gay, W., Nègre, D., Le Grand, R., Trono, D., and Cosset, F.-L. (2002). Lentiviral vectors pseudotyped with a modified RD114 envelope glycoprotein show increased stability in sera and augmented transduction of primary lymphocytes and CD34+ cells derived from human and nonhuman primates. *Blood* 100, 823–832.

Scarselli, E., Ansuini, H., Cerino, R., Roccasecca, R.M., Acali, S., Filocamo, G., Traboni, C., Nicosia, A., Cortese, R., and Vitelli, A. (2002). The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *Embo J* 21, 5017–5025.

Schlesinger, J.J., Brandriss, M.W., and Monath, T.P. (1983). Monoclonal antibodies distinguish between wild and vaccine strains of yellow fever virus by neutralization, hemagglutination inhibition, and immune precipitation of the virus envelope protein. *Virology* 125, 8–17.

Sharma, N.R., Mateu, G., Dreux, M., Grakoui, A., Cosset, F.-L., and Melikyan, G.B. (2011). Hepatitis C virus is primed by CD81 protein for low pH-dependent fusion. *Journal of Biological Chemistry* 286, 30361–30376.

Silvie, O., Charrin, S., Billard, M., Franetich, J.-F., Clark, K.L., van Gemert, G.-J., Sauerwein, R.W., Dautry, F., Boucheix, C., Mazier, D., et al. (2006). Cholesterol contributes to the organization of tetraspanin-enriched microdomains and to CD81-dependent infection by malaria sporozoites. *J Cell Sci* 119, 1992–2002.

Silvie, O., Rubinstein, E., Franetich, J.-F., Prenant, M., Belnoue, E., Rénia, L., Hannoun, L., Eling, W., Levy, S., Boucheix, C., et al. (2003). Hepatocyte CD81 is required for *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium yoelii* sporozoite infectivity. *Nat Med* 9, 93–96.

Surolia, R., Pachauri, M., and Ghosh, P.C. (2012). Preparation and characterization of monensin loaded PLGA nanoparticles: in vitro anti-malarial activity against *Plasmodium falciparum*. *J Biomed Nanotechnol* 8, 172–181.

Tai, A.W., and Chung, R.T. (2009). Treatment failure in hepatitis C: mechanisms of non-response. *Journal of Hepatology* 50, 412–420.

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

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

*Virology* 80, 1734–1741.

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

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

Yalaoui, S., Huby, T., Franetich, J.-F., Gego, A., Rametti, A., Moreau, M., Collet, X., Siau, A., van Gemert, G.-J., Sauerwein, R.W., et al. (2008). Scavenger Receptor BI Boosts Hepatocyte Permissiveness to Plasmodium Infection. *Cell Host & Microbe* 4, 283–292.

Yoshimori, T., Yamamoto, A., Moriyama, Y., Futai, M., and Tashiro, Y. (1991). Bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type H(+)-ATPase, inhibits acidification and protein degradation in lysosomes of cultured cells. *J Biol Chem* 266, 17707–17712.

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

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

Zinn, R.A., Plascencia, A., and Barajas, R. (1994). Interaction of forage level and monensin in diets for feedlot cattle on growth performance and digestive function. *J. Anim. Sci.* 72, 2209–2215.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1 : Monensin inhibits HCV infection.** (A) Huh-7 cells were infected with HCVcc-Luc in presence of 0.001% ethanol (EtOH) or increasing concentrations of Monensin added in the medium 2h before infection, 2h during infection and full-time after infection. After 24h of infection, cells were lysed and luciferase activity quantified. (B) Monensin toxicity was assayed on Huh-7 cells. Cells were cultured with increasing concentrations of Monensin and viability was tested using an MTS-based viability assay at 2 and 24h post-treatment. (C) To assess the EC<sub>50</sub> of Monensin on HCV infection, Huh-7 cells were pre-treated with Monensin 2h before, 2h during and full-time after infection with HCVcc-Luc. Cell lysates were analysed 24h post-infection for luciferase activity. (D) Cells were incubated for 2h at 37°C in medium containing Monensin (0.04 μM), Interferon (1 U/ml) or both. Cells were then infected for 2h at 37°C with HCVcc-Luc in presence of the drugs. After infection, cells were incubated again in complete medium supplemented with Monensin, Interferon or both together. Twenty-four hours post infection, cells were lysed and luciferase activity was quantified. Results are presented as mean ± SD of at least three independent experiments. \*\* and \*\*\* mean a *p* value below 0.01 and 0.001 respectively.

**Figure 2: Monensin blocks cell-to-cell transmission.** Huh-7 cells were seeded on coverslips and infected with HCVcc for 2h at 37°C. Cells were then washed and cultured for 48h at 37°C in culture medium containing the 3/11 neutralizing mAb (50μg/ml) in presence or in absence of Monensin at 0.1μM. Foci of infected cells were detected using anti-NS5A indirect immunofluorescence. The number of infected cells per focus was determined in presence of 0 (CTL) or 0.1μM Monensin and results are presented in panel B. \*\*\* means a *p* value below 0.001.

**Figure 3 : Monensin impairs HCV entry.** Huh-7 cells were infected with HCVcc-Luc (A), RD114pp or HCVpp2a (B) for 2h at 37°C and treated at different time points with 1μM monensin. Monensin was added full-time during the experiment (a), 2h before infection (b), 2h during infection (c), 2h after infection (d) or full-time after infection (e). Results are presented as mean ± SD of three independent experiments. \*, \*\* and \*\*\* mean *p* value below 0.05, 0.01 and 0.001 respectively.

**Figure 4 : Monensin does not affect HCV replication and secretion.** (A) Huh-7-Lunet-CD81 cells were electroporated with JFH1- $\Delta$ E1E2 RNA, cultured 5h at 37°C in complete culture medium, and then treated with 0 (CTL), 0.1 or 1 $\mu$ M Monensin. Cells were lysed at 24, 48 and 72h post-electroporation. F-luciferase activity was quantified to assess cell density and viability and R-luciferase activity was quantified to assess HCV replication. R-luciferase activities were normalized with F-luciferase activities (B) Huh-7 cells were infected with HCVcc. Two hours later, virus was removed and replaced by culture medium containing either 0, 0.1 or 1 $\mu$ M Monensin. Supernatants were collected 36h post-infection and used to infect naïve Huh-7 cells. Titers were determined 40h later by indirect immunofluorescence. Results are presented as mean  $\pm$  SD of three independent experiments.

**Figure 5 : Monensin affects neither viral particles nor HCV receptor expression levels.** (A) Huh-7 cells were infected with HCVcc-Luc (diluted 10 times) in the presence of 0.5 or 0.1 $\mu$ M Monensin, or with HCVcc-Luc pre-treated for 1h at 37°C with 0.5 or 1 $\mu$ M of Monensin and then diluted 10 times, to reach the final concentration of 0.5 and 0.1 $\mu$ M during infection, respectively. (B) Huh-7 cells were treated with 0 (CTL), 0.1 or 1 $\mu$ M of Monensin and stained for SRB1, CD81, CLDN-1, EGF-R and CD151 with corresponding mAbs. Expression levels were analysed by flow cytometry and results are presented as percentages of the CTL condition for each protein. OCLN levels were analyzed by western blotting (WB OCLN). Results of histograms in panels A and B are presented as mean  $\pm$  SD of three independent experiments.

**Figure 6 : Monensin inhibits HCV entry at a late step and enveloped viruses infection.** (A) Huh-7 cells were infected with HCVcc-Luc for 1h at 4°C (Step 1 : attachment/binding), then virus was removed and cells incubated again at 4°C for 1h (Step 2 : post attachment/binding). Finally, cells were shifted at 37°C for 1h (Step 3 : endocytosis/fusion) and left at 37°C for 21h. Monensin was added at 1 $\mu$ M either during the Step 1, Step 2, Step 3 or Steps 1-2-3. (B) Huh-7 or Hep-2 cells (for CVB4) were infected with indicated viruses in presence of 0 (CTL), 0.1 or 1 $\mu$ M of Monensin added in the medium 2h before, during infection and full-time after infection. HCV and SinV infections were scored by luminometry. YFV and AdV infections were scored by indirect

immunofluorescence, and flow cytometry, respectively. CVB4 infections were scored by evaluating the cytopathic effect.

**Figure 7 : Monensin leads to an alkalinization of intracellular organelles.** Huh-7 cells were treated for 2h or 24h with Monensin (0.1 or 1 $\mu$ M), Bafilomycin A1 (25 nM) or left untreated (CTL). After incubation with AO, cells were observed by confocal microscopy.

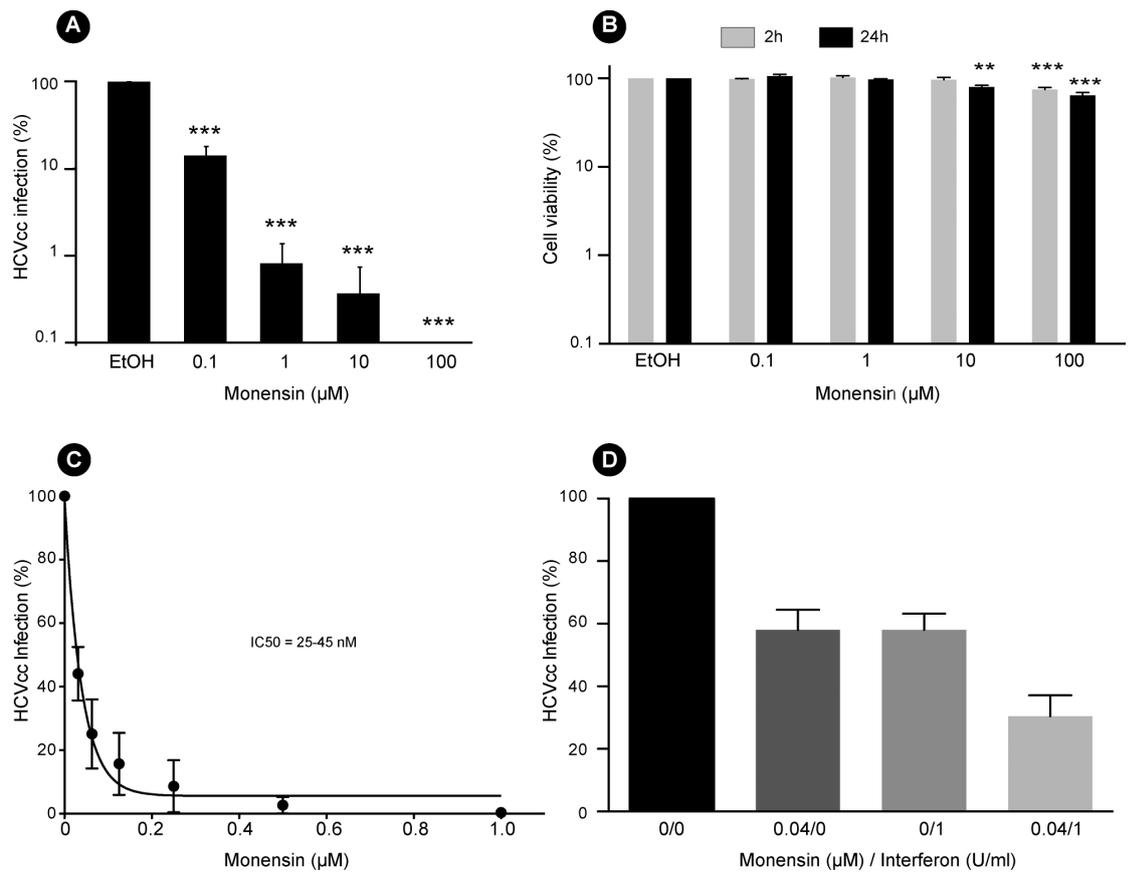


Figure 1



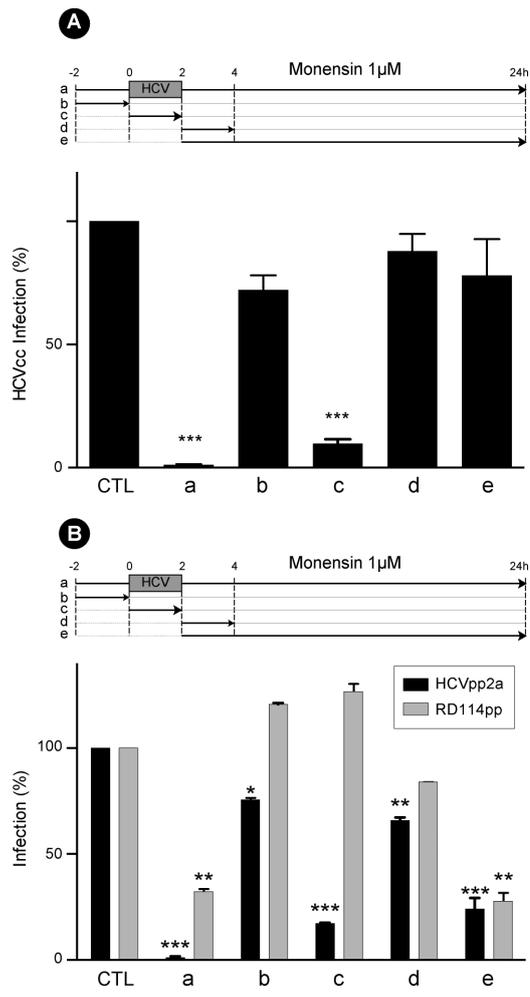


Fig 3

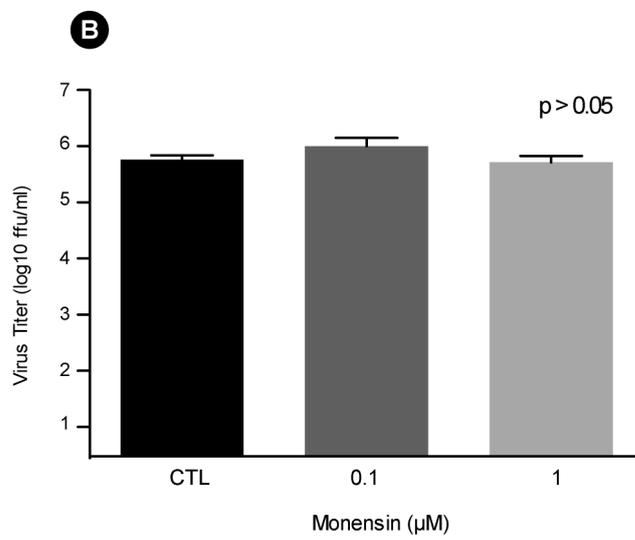
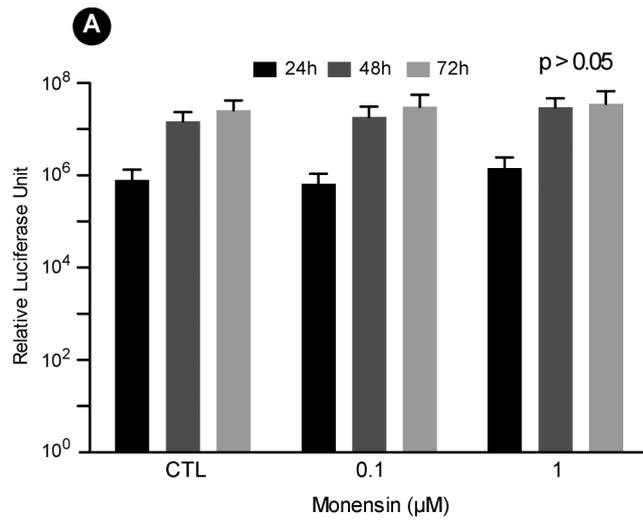


Figure 4

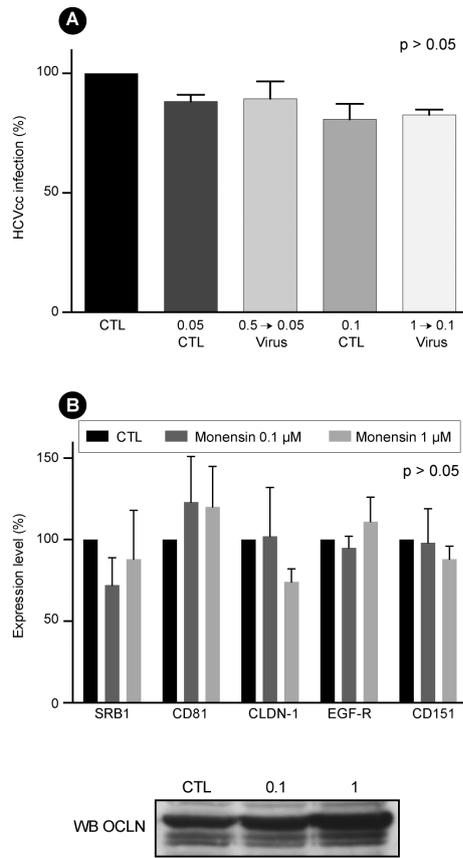


Figure 5

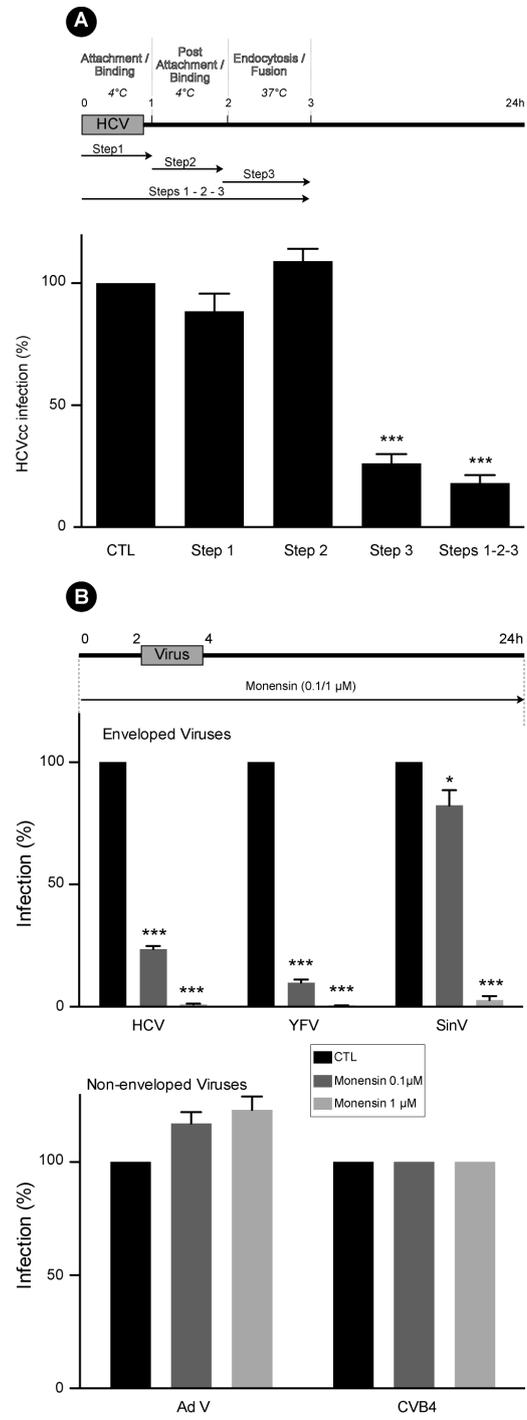


Fig 6

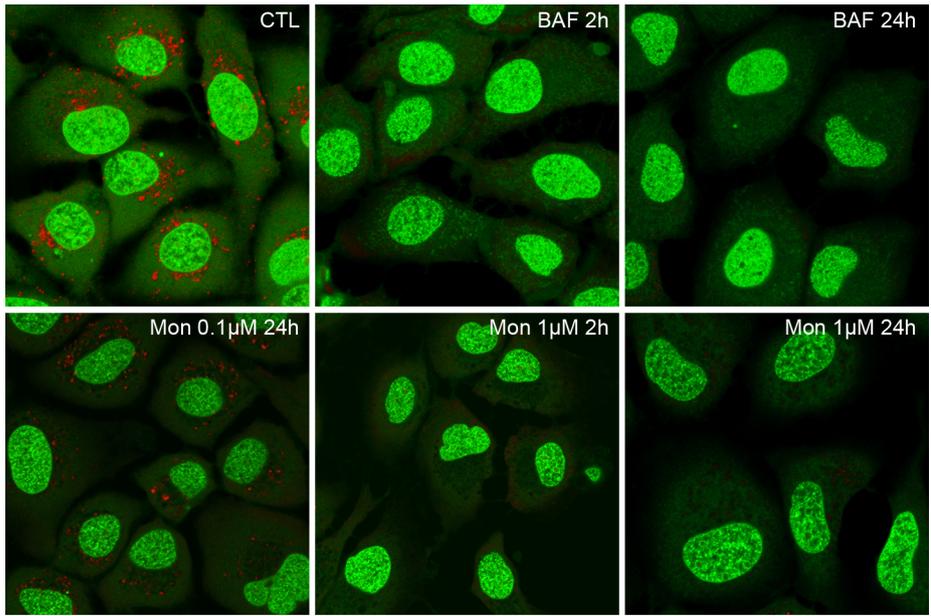


Fig 7

## **4) DISCUSSION**

## Article 1 :

### **EWI-2wint bloque l'entrée du VHC en modulant la compartimentation de CD81 à la membrane**

L'entrée du VHC dans ses cellules cibles est un processus complexe mettant en jeu une série d'interactions finement orchestrées entre le virus et des molécules de surface cellulaire.

Les travaux antérieurs du laboratoire ont montré qu'un partenaire de CD81, EWI-2wint, module ce processus d'entrée (Rocha-Perugini *et al.*, 2008). De plus en 2009, sur la base de l'utilisation de l'anticorps MT81w (Silvie *et al.*, 2006a), nous avons rapporté que le VHC n'utilise pas les molécules de CD81 associées aux TEM pour pénétrer dans ses cellules cibles (Rocha-Perugini *et al.*, 2009). Une première partie de mon travail de thèse a été consacrée à l'étude de l'effet exercé par EWI-2wint sur CD81, via des expériences de biochimie et de microscopie à haute résolution.

#### **a) EWI-2wint influence la dynamique de CD81 et l'entrée du VHC**

Dans le but de définir si EWI-2wint influence la dynamique et l'organisation membranaire de CD81, nous avons réalisé des expériences de SMT en microscopie TIRF. Ainsi, les trajectoires de molécules uniques de CD81 ont été suivies dans différents clones cellulaires issus de la lignée Huh-7, qui exprime de manière endogène CD81 et EWI-2. En parallèle d'un clone surexprimant EWI-2, nous avons généré des clones cellulaires exprimant la construction EWI-2<sup>fur</sup> (EWI-2wint1-2-3), qui exprime EWI-2 et produit EWI-2wint, mais également deux clones contrôles exprimant soit le mutant Qcc ou soit le mutant LAL. Le mutant Qcc correspond à la construction EWI-2<sup>fur</sup> dans laquelle la queue cytoplasmique a été échangée par celle du MHC classe II mais les deux cystéines juxtamembranaires palmitoylables conservées. Cette chimère palmitoylée interagit avec CD81 et permet de tester l'importance des interactions intracellulaires de EWI-2/EWI-2wint, avec le cytosquelette notamment. Le mutant LAL correspond à la séquence de EWI-2<sup>fur</sup> dans laquelle le motif glycine zipper du TM a été muté. Ce mutant n'interagissant plus avec CD81 permet d'analyser l'importance de l'interaction entre EWI-2/EWI-2wint et CD81. Au cours des expériences de SMT, en plus de CD81, la

dynamique de deux protéines membranaires contrôles a été étudiée : CD9, une autre tétraspanine interagissant avec EWI-2 et EWI-2wint, et CD46, une protéine qui est associée ni aux TEM ni aux radeaux lipidiques.

Ces expériences ont tout d'abord montré que la diffusion membranaire de CD81 à la membrane basale est comparable à celle de CD9, avec des trajectoires Browniennes, confinées et mixtes (une combinaison des deux premières) (Espenel *et al.*, 2008; Krementsov *et al.*, 2010). Toutefois, il est apparu que CD81 est plus confinée que CD9, ce qui a été observé au cours d'autres études dans des lignées cellulaires différentes telles que les cellules CHO, PC3 ou Hela (résultats non publiés).

Plus précisément, notre étude a révélé que la présence de EWI-2wint influence spécifiquement la dynamique membranaire de CD81. En effet, aucune influence de EWI-2wint sur le comportement de CD9 et CD46 n'a été mise en évidence. Au contraire, la dynamique de CD81 était modifiée dans les cellules exprimant EWI-2wint par rapport aux cellules contrôles exprimant la protéine parentale EWI-2. Dans la lignée contrôle, le profil de dynamique des molécules de CD81 décrit trois groupes distincts : une population très dynamique, une autre très lente et un groupe majoritaire présentant un coefficient de diffusion intermédiaire. Dans les cellules exprimant EWI-2wint, nous avons observé une diminution du coefficient de diffusion moyen de CD81. En corrélation avec cette observation, nos résultats ont indiqué une augmentation de la proportion de trajectoires confinées, une baisse de la vitesse de diffusion des trajectoires Browniennes et l'apparition d'une population hautement confinée. Il est probable que l'augmentation du nombre de confinements de CD81 traduise une séquestration de cette protéine dans des domaines de la membrane en présence de EWI-2wint. Egalement, puisque la vitesse de diffusion d'un complexe est directement dépendante de sa taille (Gambin *et al.*, 2006), la diminution du coefficient de diffusion des trajectoires Browniennes en présence de EWI-2wint témoigne probablement de la diffusion de molécules de CD81 associées à de plus gros complexes dynamiques. Egalement, nous avons pu observer une augmentation significative du temps de confinement des molécules à trajectoire mixte en présence d'EWI-2wint, suggérant là encore une séquestration de CD81 à la membrane. Afin d'aller plus loin dans la compréhension de l'effet de EWI-2wint sur la dynamique de CD81, nous avons réalisé des expériences similaires dans une autre lignée cellulaire : des cellules CHO exprimant hCD81 (CHO/hCD81) en combinaison avec EWI-2 ou EWI-2/EWI-2wint. Puisque le clivage de EWI-2 générant EWI-2wint a lieu dans ces

cellules, nous avons utilisé une construction non clivable de EWI-2 pour générer la lignée CHO/hCD81/EWI-2. De manière intéressante, nous avons observé que l'expression de EWI-2wint ralenti également la dynamique de CD81 dans le contexte de la lignée CHO.

Il est admis que le contenu lipidique des membranes influence la dynamique des molécules membranaires. Dans ce sens, nous ne pouvons pas exclure que la présence de EWI-2wint module la composition lipidique membranaire. Cependant, il semble que la modulation de la diffusion de CD81 soit plutôt médiée par des interactions protéiques. En effet, en présence du mutant LAL qui n'interagit plus avec CD81, la dynamique de CD81 est comparable à celle obtenue dans les cellules contrôles exprimant EWI-2. A l'inverse pour le mutant Qcc, qui interagit avec CD81 et possède une queue cytosolique différente, le profil dynamique tend vers celui observé dans les cellules exprimant la protéine EWI-2wint sauvage. Ceci suggère premièrement que l'interaction entre EWI-2/EWI-2wint et CD81 est indispensable au ralentissement de la dynamique de CD81 et, deuxièmement, que l'association entre la queue cytoplasmique de EWI-2/EWI-2wint et le cytosquelette ne module probablement pas ce processus. Dans ce sens également, nos résultats ont montré une interaction plus forte entre les protéines EWI et CD81 lorsque EWI-2wint est présent. Enfin, dans des expériences d'immunoprécipitation de CD81 après un pontage chimique et la lyse des cellules en conditions préservant les interactions entre les tétraspanines, nous avons mis en évidence la présence de complexes de haut poids moléculaire, correspondants à des oligomères de CD81, dans les cellules exprimant EWI-2wint par rapport aux cellules contrôles. Concernant l'interaction entre EWI-2wint et CD81, nous ne pouvons pas exclure qu'il s'agisse d'une liaison indirecte via EWI-2 puisque EWI-2 et EWI-2wint forment des hétérodimères à la surface cellulaire (Montpellier *et al.*, 2011).

En parallèle des expériences de dynamique, nous avons testé l'infectabilité des différents clones cellulaires par des VHCcc. De manière intéressante, nos résultats indiquent qu'il existe une corrélation entre la capacité de EWI-2wint à moduler la dynamique de CD81 et son pouvoir inhibiteur de l'infection. En effet, contrairement aux clones infectables par les VHCcc (EWI-2 et LAL), les clones cellulaires inhibiteurs en infection étaient ceux pour lesquels la dynamique de CD81 était altérée (EWI-2wint et Qcc).

L'ensemble de ces résultats indique donc que le confinement de CD81 à la membrane constitue un contexte défavorable à l'entrée du VHC.

### **b) EWI-2wint favorise la reconnaissance par l'anticorps MT81w**

En 2006, Silvie et collaborateurs ont décrit le MT81 et le MT81w, deux anticorps anti-mCD81 qui reconnaissent respectivement l'ensemble des molécules de mCD81 ou uniquement les molécules de CD81 engagées dans les TEM (Silvie *et al.*, 2006a). Afin de conclure à une reconnaissance du mCD81 associé aux TEM par le MT81w, les auteurs se sont basés sur des expériences de co-immunoprécipitation dans des conditions préservant les interactions tétraspanine-tétraspanine ainsi que de déplétion en CD9. Ils ont ainsi montré que l'absence de CD9 diminue le marquage par le MT81w.

Dans notre étude, nous avons généré des clones de cellules Huh-7w7 (dépourvus de CD81 endogène) exprimant le mCD81 en combinaison avec EWI-2 ou EWI-2/EWI-2wint. Dans des expériences de cytométrie en flux, nous avons pu observer une augmentation de la reconnaissance par le MT81w lorsque EWI-2wint était exprimée, suggérant que cette protéine favoriserait l'association de CD81 avec d'autres tétraspanines. Ce résultat est en accord avec notre étude publiée en 2009 au cours de laquelle il a été démontré que le VHC n'utilise pas de manière préférentielle les molécules de CD81 associées aux TEM pour entrer dans les cellules (Rocha-Perugini *et al.*, 2009). Ainsi, en favorisant l'association de CD81 avec les TEM, EWI-2wint pourrait diminuer le nombre de molécules de CD81 compétentes pour l'entrée virale.

Etant donné que les structures reconnues par le MT81w sont, à l'inverse du VHC, utilisées par *Plasmodium* pour entrer dans les cellules hépatiques (Silvie *et al.*, 2006a), il serait intéressant de tester l'effet de l'expression de EWI-2wint sur l'entrée des sporozoïtes de *Plasmodium*. En effet, puisque EWI-2wint semble favoriser l'association de CD81 avec les structures reconnues par le MT81w, on peut imaginer que l'entrée de *Plasmodium* pourrait être favorisée en présence de EWI-2wint. Egalement, il pourrait être intéressant d'étudier la dynamique membranaire de CD81 en absence et en présence de EWI-F, une protéine inhibitrice de l'invasion par *Plasmodium*, afin d'analyser l'importance de la dynamique de CD81 dans l'entrée de ce parasite.

Afin d'appuyer nos résultats, des expériences de colocalisation en microscopie TIRF ont été réalisées sur les différents clones cellulaires Huh-7. En effet, si EWI-2wint

favorise l'interaction entre CD81 et d'autres tétraspanines, la colocalisation membranaire entre CD81 et CD9 pourrait être affectée en présence de EWI-2wint. De manière surprenante, les résultats n'étaient pas en corrélation avec la conclusion des expériences effectuées avec le MT81w, puisqu'aucune augmentation de la colocalisation entre CD81 et CD9 n'a pu être mise en évidence en présence de EWI-2wint. Au contraire, il est apparu que les confinements de CD81 seraient plutôt localisés au niveau de zones enrichies en CD81. Bien que nous n'ayons testé la colocalisation de CD81 qu'avec CD9 et qu'il serait intéressant de reproduire cette expérience en analysant d'autres tétraspanines, nous avons cherché à discriminer entre une reconnaissance des TEM par le MT81w ou une moindre affinité qui le conduirait à marquer préférentiellement des structures enrichies en CD81.

### **c) L'anticorps MT81w est un anticorps de faible affinité dirigé contre le mCD81**

En 2011, le laboratoire a identifié les régions d'interaction entre EWI-2/EWI-2wint et CD81 (Montpellier *et al.*, 2011). Dans cette étude, deux chimères entre CD81 et CD82 ont montré une augmentation de l'oligomérisation de CD81 lorsque les TM3 ou TM4 étaient remplacés par les régions correspondantes de CD82. Afin de tester l'influence de l'oligomérisation de CD81 sur la reconnaissance par l'anticorps MT81w, nous avons reproduit ces deux chimères dans le contexte du mCD81 et transfecté ces constructions mTM3 et mTM4 dans des cellules Huh-7w7. Des expériences d'immunoprécipitation et de cytométrie en flux ont ensuite révélé une corrélation entre l'augmentation de l'oligomérisation de CD81 et une plus forte reconnaissance par le MT81w, particulièrement dans le cas de la chimère mTM4. Cela suggère donc que le MT81w serait plutôt un anti-mCD81 de faible affinité reconnaissant plus efficacement les multimères de CD81.

Les expériences de Silvie et collaborateurs ont pourtant montré que la déplétion en CD9 altère la reconnaissance par cet anticorps (Silvie *et al.*, 2006a). Comme pour l'anticorps C9BB, un anti-CD9 de faible affinité dont la reconnaissance peut être modulée par les partenaires de CD9 (les protéines EWI et les intégrines) (Yang *et al.*, 2006), nous pouvons envisager que l'absence d'une molécule puisse déplacer les interactions entre tétraspanines et partenaires, d'autant plus que CD9 et CD81 partagent des partenaires communs. Ainsi, l'absence de CD9 libérerait des partenaires qui, en interagissant avec

CD81, diminueraient son organisation en oligomères. Cela pourrait expliquer la baisse de reconnaissance par le MT81w dans les expériences de déplétion en CD9.

Dans le sens d'une plus faible affinité de l'anticorps MT81w, nous avons montré qu'un traitement par la Smase favorise la reconnaissance par cet anticorps (Rocha-Perugini *et al.*, 2009). Or, il a été montré qu'un enrichissement en céramides favorise la formation de clusters dans le cas de diverses molécules (Zhang *et al.*, 2009). Afin de confirmer nos résultats, il serait intéressant de tester l'effet d'un traitement par la Smase sur la dynamique de CD81 dans des expériences de SMT, pour observer si l'effet de la Smase est comparable aux résultats que nous avons obtenus en présence de EWI-2wint.

#### **d) Le VHC n'utilise pas les clusters de CD81 pour entrer dans les cellules**

L'ensemble des résultats publiés par notre équipe depuis quatre ans converge vers une utilisation préférentielle des molécules de CD81 non-clusterisées par le VHC pour entrer dans les cellules cibles. En effet, nous avons montré que l'anticorps MT81w, un anticorps de faible affinité reconnaissant préférentiellement les oligomères de CD81, ne neutralise que faiblement l'infection (Rocha-Perugini *et al.*, 2009). De plus, les chimères TM3 et TM4, pour lesquelles l'oligomérisation de CD81 est augmentée, ne restaurent par l'infection dans les cellules Huh7w7 (Montpellier *et al.*, 2011). Enfin, la première partie de mon travail de thèse montre que EWI-2wint, un inhibiteur naturel de l'entrée du VHC, bloque l'entrée du VHC et favorise la formation de clusters de CD81 reconnus par le MT81w.

Récemment, une équipe chinoise a publié une étude concluant à une utilisation des molécules de CD81 associées au TEM par le VHC (Zhu *et al.*, 2012). Les auteurs ont dans un premier temps testé le rôle de la palmitoylation de CD81 dans l'interaction avec EWI-2 et CD151 et les résultats montrent que la mutation des huit cystéines palmitoylées de CD81 entraîne une diminution mineure (de l'ordre de 10%) de l'interaction avec EWI-2 mais une disparition presque totale de l'association à CD151. Dans nos conditions, aucune influence de la palmitoylation de CD81 sur l'interaction avec EWI-2/EWI-2wint n'avait été observée (Montpellier *et al.*, 2011). Cependant dans nos expériences, seules six cystéines de CD81 étaient mutées contre huit dans les expériences de Zhu et collaborateurs, ce qui pourrait expliquer la différence observée. D'ailleurs, une autre étude rapporte que la mutation des huit cystéines palmitoylables de

CD81 diminue sa liaison à CD9 et EWI-2 (Delandre *et al.*, 2009). Ensuite, les auteurs ont étudié l'effet de la palmitoylation de CD81 sur sa répartition au sein d'un gradient de densité, après lyse des cellules avec une solution contenant du Brij97, une condition qui préserve les TEM intacts. Ils ont alors montré que la dépalmitoylation de cette tétraspanine ne modifie pas sa localisation en gradient de densité et ont conclu que l'association de CD81 aux radeaux lipidiques n'est pas modifiée. Or, il est admis que CD81 n'est pas une protéine résidente des radeaux lipidiques. Les auteurs font, dans cet article, une confusion globale entre les radeaux lipidiques, les TEM et les microdomaines riches en lipides. Si la flottaison de CD81 n'est pas altérée par la dépalmitoylation, il semble qu'étant donné le contenu lipidique des TEM, une conclusion plus appropriée serait que la palmitoylation n'influence pas la formation ni le maintien des TEM dans ces conditions. Une étude de 2008 basée sur des expériences de microscopie à haute résolution va également dans ce sens. En effet, Espenel et collaborateurs ont montré qu'un mutant de palmitoylation de CD9 ne modifie pas le nombre de structures ponctuelles enrichies en CD9 (appelées aussi TEAs) à la membrane plasmique, ni le temps des confinements transitoires de CD9 dans ces TEAs (Espenel *et al.*, 2008). Aussi, dans l'étude de Zhu et collaborateurs, on ne peut pas exclure que, même en l'absence d'interaction avec CD151, les TEM soient maintenus. Ensuite, les auteurs ont testé l'effet de la dépalmitoylation de CD81 sur la liaison à sE2 et l'infection par des VHCpp et VHCcc. Ils ont montré qu'un mutant de CD81 dépalmitoylé garde sa capacité à interagir avec sE2, tandis qu'il ne médie plus totalement l'entrée de VHCpp et VHCcc, qui est respectivement réduite de 60 et 40% par rapport au CD81 sauvage. De la même façon, ils ont décrit que la réduction de l'expression de CD151 par ARN interférence altère l'entrée des VHCpp et VHCcc. Ils ont aussi démontré que la dépalmitoylation de CD81 et l'absence de CD151 bloqueraient l'entrée virale à une étape post-attachement, probablement lors du mouvement latéral du virus vers les molécules de CLDN-1. Ainsi, considérant que l'absence de palmitoylation de CD81 abolit la formation des TEM, ils ont conclu que les TEM sont nécessaires à la relocalisation des complexes virus-récepteurs vers les jonctions serrées. Néanmoins, comme expliqué en amont, leur expérience de flottaison en gradient de densité n'est pas en faveur d'une modification des TEM en l'absence de dépalmitoylation et l'effet de l'absence de CD151 sur l'intégrité des TEM n'a pas été montré. De plus, comme développé dans l'introduction (**Partie I.C.2.b**) le fait que le virus soit relocalisé au niveau des TJ pour interagir avec CLDN-1 est controversé.

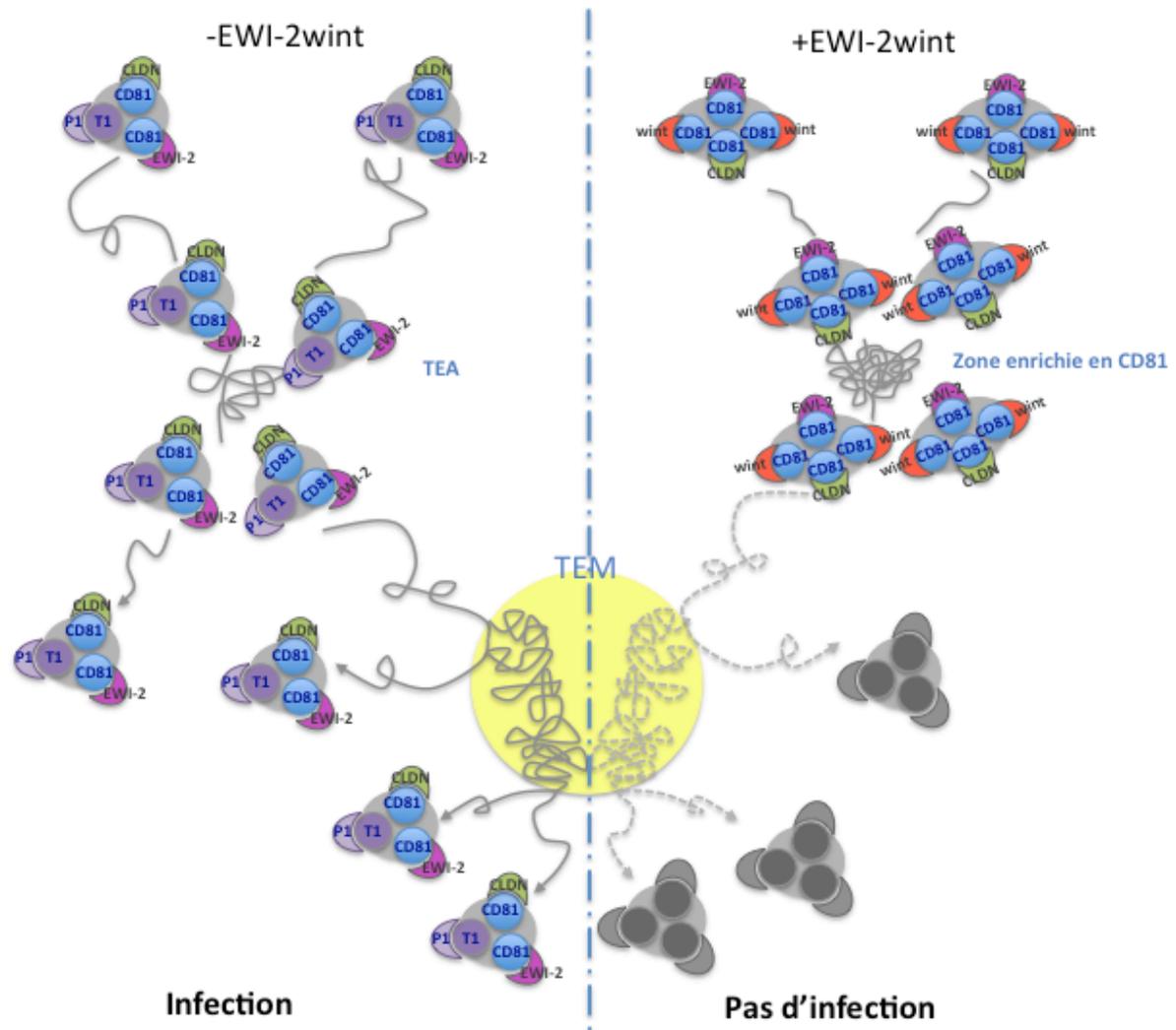
Puisque nous avons mis en évidence un rôle des molécules de CD81 mobiles à la membrane dans l'entrée du VHC, il est possible que la dépalmitoylation ou l'absence de CD151, sans modifier les TEM, influence les interactions au sein des petits complexes circulants en dehors des TEM. Dans ce sens, il a été montré par exemple que la palmitoylation de CD9 influence sa diffusion, en favorisant probablement son association avec d'autres protéines au sein des complexes qui diffusent (Espanel *et al.*, 2008). Egalement, il a été décrit que la dépalmitoylation de tétraspanines pouvait moduler leurs interactions et leur répartition membranaire (Yang *et al.*, 2006). Il est donc possible que la dépalmitoylation de CD81 altère son interaction avec des partenaires impliqués dans l'entrée du VHC, tels que CLDN-1.

Un autre travail récent réalisé par le laboratoire de Jane McKeating a montré, dans le sens de nos observations, que la mobilité membranaire de CD81 est corrélée au niveau d'infection par le VHC (Harris *et al.*, 2012). En effet, ils ont montré qu'une diffusion libre de CD81 à la membrane est nécessaire à l'entrée du VHC. Dans des expériences de FRAP et de SMT, ils ont par exemple rapporté qu'une protéine CD81 mutée dans son domaine C-terminal était moins mobile dans des cellules HepG2 non-polarisées par rapport aux mêmes cellules exprimant CD81 non mutée. En parallèle, leurs résultats d'expériences d'infection de ces deux lignées ont montré que l'infection est inhibée lorsque la queue cytoplasmique de CD81 est mutée. Une deuxième observation permet de relier la dynamique de CD81 à son pouvoir médiateur de l'infection par le VHC. En effet, l'entrée du virus dans les cellules HepG2/CD81 polarisées est inhibée par rapport à ce qui est observé dans les cellules non-polarisées. En corrélation avec cela, une diminution de la diffusion de CD81 et une augmentation de la fréquence de confinements est observée dans les cellules polarisées. Les résultats de cette étude vont donc dans le sens des nôtres. En effet, l'ensemble de ces travaux a démontré que des événements limitant la diffusion membranaire de CD81 (en l'occurrence la présence de EWI-2wint, la mutation du segment cytoplasmique de CD81 ou la polarisation cellulaire) interfèrent avec l'entrée du VHC, suggérant que les molécules de CD81 qui diffusent, et donc non-engagées dans des microdomaines statiques, sont utilisées par le VHC.

Lors de la découverte de la protéine EWI-2wint et de son effet inhibiteur sur l'entrée du VHC, des études d'interactions *in vitro* avaient montré que la présence de cette protéine empêchait la liaison entre CD81 et les glycoprotéines d'enveloppe du virus (Rocha-Perugini *et al.*, 2008). Aujourd'hui, notre travail montre que l'effet d'EWI-2wint sur l'infection corrèle avec une modification de la répartition membranaire de CD81. Bien qu'impliquant un mécanisme d'inhibition différent, ces deux observations ne sont pas nécessairement mutuellement exclusives. En effet, l'une des hypothèses les plus probables est que, en réorganisant les molécules de CD81 à la surface des cellules, EWI-2wint rendrait ce récepteur moins accessible au virus. Des expériences complémentaires seront nécessaires pour tenter de mettre cela en évidence. Nous envisageons notamment des tests d'interaction entre CD81 et les hétérodimères E1E2 avec les lignées Huh-7 exprimant les mutants de EWI-2/EWI-2wint, le Qcc et le LAL. De cette façon, nous pourrions établir s'il existe une corrélation entre la clusterisation de CD81 et le blocage de son interaction avec le virus.

#### e) Effet d'EWI-2wint sur les complexes CD81-CLDN-1

Etant donné le caractère essentiel de la formation de complexes entre CD81 et CLDN-1 pour l'entrée du VHC (Evans *et al.*, 2007; Harris *et al.*, 2010; Krieger *et al.*, 2010), nous nous sommes intéressés à l'effet de EWI-2wint sur cette interaction. Bien que des analyses quantitatives n'aient pas été effectuées, des expériences de colocalisation en microscopie confocale ont été menées et ont rapporté une augmentation significative de la colocalisation entre CD81 et CLDN-1 en présence de EWI-2wint. Il semble donc que, en piégeant CD81 dans les TEAs, EWI-2wint séquestre également CLDN-1. Dans une vue plus globale de l'entrée du VHC, il apparaît alors que CD81 et CLDN-1 interagissent au sein des TEAs et peuvent s'en échapper. Ainsi, le virus exploiterait ces complexes et leur dynamique pour entrer efficacement dans les cellules. En présence de EWI-2wint, on peut imaginer que la séquestration de ces deux molécules dans les TEAs bloque la série séquentielle d'événements nécessaires à l'entrée du VHC (**Figure 33**).



**Figure 33 : Modèle de la dynamique de CD81 et CLDN-1 en absence et présence de EWI-2wint**

(Inspiré de Charrin *et al.*, 2009)

**En l'absence de EWI-2wint**, les tétraspanines (cercles) diffusent dans la membrane associées à leurs partenaires (demi-cercles) sous forme de petits complexes dynamiques qui peuvent être piégés localement au sein de zones enrichies en tétraspanines.

**En présence de EWI-2wint**, la clusterisation de CD81 est favorisée. Les co-récepteurs du VHC CD81 et CLDN-1 sont séquestrés au sein de ces complexes moins dynamiques et plus confinés au niveau des zones enrichies en CD81. Ainsi, la séquence d'événements nécessaire à l'entrée du VHC est interrompue et l'infection est inhibée.

Pour définir précisément si EWI-2wint influence la dynamique de CLDN-1 à la surface et séquestre ce récepteur du VHC, des expériences de suivi de molécules uniques de CLDN-1 en SMT seraient à envisager dans les lignées Huh-7 exprimant ou non EWI-2wint. Egalement, puisqu'il apparaît que SRB1 et CD81 coopèrent au cours de l'entrée virale, il serait intéressant de réaliser des expériences de SMT afin d'observer la dynamique de SRB1 en absence et en présence de EWI-2wint.

De manière intéressante, les résultats récents du laboratoire de Jane McKeating corroborent notre hypothèse (Barnes A, Septembre 2012, 5th European Conference on Tetraspanins, Nijmegen, Pays-Bas). En effet, leurs expériences de SMT ont révélé une diminution de la dynamique de CD81 mais aussi de CLDN-1 dépendamment de la polarisation. Puisque les cellules polarisées sont moins infectables par le VHC, il apparaît que dans un contexte défavorable à l'infection, la dynamique de CD81 et CLDN-1 soit restreinte.

#### **f) EWI-2wint n'inhibe pas la transmission de cellule à cellule du VHC**

Comme évoqué au cours de l'introduction, afin de faciliter et de favoriser la transmission virale mais également dans le but d'échapper au système immunitaire, certains virus utilisent deux voies d'entrée dans les cellules : la première implique des particules virales libres dans le milieu extracellulaire tandis que la deuxième nécessite un contact entre deux cellules afin de délivrer le virus directement d'une cellule infectée donneuse vers une cellule non-infectée receveuse. De plus en plus de travaux soulignent l'importance de cette deuxième voie d'entrée dans la transmission du VHC (Timpe *et al.*, 2008; Brimacombe *et al.*, 2011). Bien que le mécanisme précis mis en jeu lors de la transmission de cellule à cellule du VHC ne soit pas connu, cette voie d'entrée a été étudiée et il apparaît que SRB1, CLDN-1 et OCLN soit impliquées (Timpe *et al.*, 2008; Ploss *et al.*, 2009; Brimacombe *et al.*, 2011; Ciesek *et al.*, 2011a; Meuleman *et al.*, 2012; Zahid *et al.*, 2012). Par contre, le rôle de CD81 reste controversé puisque certaines études rapportent qu'il s'agit d'un voie d'entrée CD81-indépendante (Timpe *et al.*, 2008; Witteveldt *et al.*, 2009; Jones *et al.*, 2010), alors que d'autres décrivent l'importance de CD81 dans cette transmission du virus de cellule à cellule (Russel *et al.*, 2008; Brimacombe *et al.*, 2011). Afin de définitivement discriminer entre ces deux possibilités, nous avons testé si le VHC peut être transmis de cellule à cellule lorsque la cellule receveuse n'exprime pas CD81. Pour cela, nous avons co-cultivé des cellules Huh-7 donneuses infectées avec des cellules Huh-7w7 receveuses non-infectées en absence ou en présence d'anticorps neutralisants. Les résultats ont clairement indiqué que les cellules Huh-7w7 sont résistantes à l'entrée médiée par les particules libres mais également à la transmission de cellule à cellule. Ainsi, nous avons confirmé le rôle de CD81 dans le passage du virus de cellule à cellule.

Ensuite, aux vues de l'inhibition de l'infection observée en présence de EWI-2wint, nous avons analysé l'effet de EWI-2wint sur la transmission du VHC de cellule à cellule. Nos résultats démontrent que seule l'entrée impliquant des particules libres est affectée par la présence de EWI-2wint. Le fait que EWI-2wint n'interfère pas avec le passage du virus de cellule à cellule suggère que, bien que nécessitant des molécules communes, les deux voies d'entrée du virus mettent en jeu des mécanismes différents. Il semble ainsi que la diffusion de CD81, altérée en présence de EWI-2wint, soit déterminante pour l'entrée de particules virales libres dans le milieu extracellulaire mais pas pour la transmission directe du virus de cellule à cellule

#### **g) La poursuite de la caractérisation de EWI-2wint**

Dans un effort de poursuivre la caractérisation de la protéine EWI-2wint, il serait intéressant de découvrir la protéase responsable du clivage entre les domaines Ig1 et Ig2 de EWI-2 et permettant la production de EWI-2wint. Le site consensus de clivage de EWI-2 en EWI-2wint (RGR) ne correspond à aucun site de protéase connue. Il faudrait donc tester plusieurs familles d'inhibiteurs de protéases afin d'essayer d'en identifier une impliquée dans ce clivage. A l'heure actuelle, il est seulement établi que cette protéase n'est pas la furine. En effet, cette protéase est présente et accessible à EWI-2 dans les cellules Huh-7 (au sein desquelles le clivage n'a pas lieu naturellement) puisque la construction EWI-2<sup>fur</sup> y est clivée (Rocha-Perugini *et al.*, 2008; Montpellier *et al.*, 2011). De plus, il semble que la protéase responsable du clivage de EWI-2 en EWI-2wint serait résidente d'un compartiment intracellulaire post-RE car le clivage a lieu après la maturation des N-glycanes (Montpellier *et al.*, 2011).

Egalement, il serait intéressant de produire des formes tronquées et solubles de la protéine EWI-2wint, afin de tester si ces peptides sont capables de reproduire les effets observés avec la protéine entière. Puisque nous avons montré que l'interaction entre EWI-2/EWI-2wint et CD81 est nécessaire pour que EWI-2wint altère la diffusion de CD81 et plus généralement le processus d'entrée du VHC et sachant que, au sein du domaine extracellulaire de EWI-2/EWI-2wint, seul le domaine Ig4 est impliqué dans l'interaction avec CD81, il apparaît que les peptides solubles devront comporter au minimum le domaine Ig4.

Enfin, dans le but de tester l'infection par le VHC *in vivo* en présence de EWI-2wint, il serait intéressant de générer des souris infectables par le virus et exprimant EWI-2wint. Pour cela, une collaboration a été initiée avec l'équipe d'Alexander Ploss à New-York. Cette équipe a en effet publié un modèle murin qui, à la suite d'une combinaison d'infections adénovirales, exprime les récepteurs humains nécessaires à l'infection par le VHC et permet une quantification de l'entrée du virus par la luciférase (Dorner *et al.*, 2011). Si l'expression de EWI-2wint dans les cellules hépatiques de ces animaux s'avère relevante, nous pourrions alors tester *in vivo* l'effet de cette protéine sur l'infection par le VHC.

## Article 2 :

### **La Monensine inhibe une étape tardive de l'entrée du VHC**

La Monensine, un ionophore qui induit une augmentation du pH intracellulaire, possède des activités antivirales et anti-parasitaires sur différents pathogènes, dont *Plasmodium*. Dans une deuxième partie de mon travail de thèse, nous avons analysé l'effet de la Monensine sur l'infection par le VHC.

#### **a) La Monensine inhibe l'entrée du VHC**

Dans un premier temps, nous avons réalisé des infections par les VHCcc en présence de Monensine à différentes concentrations. La drogue a été incubée avec les cellules 2h avant, pendant et jusqu'à 24h après l'infection. Aux concentrations 0,1 et 1  $\mu\text{M}$ , qui ne présentent aucune toxicité cellulaire, l'inhibition était respectivement proche de 80 et 100%. La concentration permettant 50% d'inhibition de l'infection (IC50) a été estimée à 25-45 nM. A titre de comparaison, dans l'étude de Leitao et collaborateurs, l'inhibition maximale de l'infection par *P. Yoelii* dans des cellules Hepa1-6 était atteinte pour des concentrations de l'ordre de 0,01 à 1  $\mu\text{M}$  dans une expérience similaire (Leitao & Rodriguez, 2010).

Afin de préciser l'étape du cycle viral affectée par la présence de Monensine, des expériences de cinétiques ont été effectuées. Pour cela, la Monensine a été ajoutée à différents temps au cours de l'infection et les résultats ont démontré que la drogue agit pendant l'étape d'infection. En effet, ni la pré-incubation des cellules, ni l'ajout de la drogue 2h après le début de l'infection n'avait un effet sur l'infection. De plus, nous avons mis en évidence un effet de la Monensine sur l'infection par des VHCpp. Puisque cet outil permet l'étude de l'étape d'entrée des particules virales dans les cellules, ce résultat confirme le blocage de l'entrée virale par la Monensine. Des expériences de cinétiques sur l'infection par les VHCpp ont également été réalisées et confirment une action de la Monensine pendant l'infection. Une légère inhibition a été observée lorsque les cellules étaient pré-incubées avec le composé ou lorsqu'il était ajouté 2h après l'infection. Néanmoins, cette inhibition est probablement liée à la présence résiduelle de

Monensine lors de l'infection dans le premier cas et, dans le deuxième cas, à un effet relatif aux particules virales non encore entrées dans les cellules. Enfin, des expériences préliminaires ont été réalisées afin de tester l'influence du génotype viral sur l'inhibition de l'entrée par la Monensine, en utilisant des VHCpp portant à leur surface les glycoprotéines de divers génotypes. Bien que ces résultats restent à confirmer, il semblerait que la Monensine bloque l'entrée du VHC indépendamment du génotype testé.

Dans le but de confirmer un effet de la Monensine sur l'étape d'entrée et d'exclure des effets additionnels, nous avons vérifié les conséquences de sa présence sur les étapes plus tardives du cycle du VHC, à savoir la réplication, l'assemblage et la sécrétion du virus. Des expériences d'électroporation d'un ARN viral défectif pour l'assemblage dans les cellules ont permis de montrer que la Monensine n'agit pas sur l'étape de réplication. Aussi, nous avons évalué la capacité des cellules à produire du virus en absence et en présence de Monensine et avons montré qu'elle n'était pas altérée en présence de la drogue, indiquant que les étapes d'assemblage et de sécrétion ne sont pas affectées par la Monensine.

#### **b) La Monensine n'agit pas sur les particules virales**

Un composé inhibiteur d'entrée virale peut affecter soit la cellule cible ou soit le virus. Par exemple, il a été récemment montré que l'EGCG, une molécule inhibitrice de l'attachement du VHC sur les cellules, agit directement sur le virus et non sur les cellules (Calland *et al.*, 2012; Ciesek *et al.*, 2011b).

Nous avons montré que la Monensine présente un effet inhibiteur lorsqu'elle est ajoutée pendant l'infection, c'est-à-dire lorsqu'à la fois les cellules et le virus sont présents et peuvent être affectés. De ce fait, dans le but d'établir si la Monensine agit directement sur les particules virales, nous avons incubé le virus en présence de Monensine avant d'infecter les cellules. Dans ces expériences, nous n'avons observé aucune inhibition de l'infection, ce qui suggère que la Monensine n'agit pas sur le virus, mais affecterait plutôt les cellules cibles.

### c) La Monensine interfère avec une étape tardive de l'entrée virale

L'étape d'entrée du VHC comprend plusieurs phases successives : l'attachement à la surface cellulaire, l'interaction avec les récepteurs spécifiques, l'endocytose dépendante de la clathrine et enfin la fusion des membranes virale et cellulaire dans les endosomes précoces. Afin de définir l'étape de l'entrée affectée par la Monensine, des expériences de cinétique ont été réalisées. Pour cela, les cellules ont été incubées une première fois pendant 1h à 4°C en présence du virus, pour permettre l'attachement des particules virales aux cellules. Ensuite, le virus a été enlevé et les cellules laissées à 4°C de façon à continuer l'attachement du virus et sa liaison aux récepteurs spécifiques. Enfin, dans un troisième temps, les cellules ont été transférées à 37°C, étape qui permet l'endocytose des particules virales puis la fusion dans les endosomes. La Monensine a donc été ajoutée à chacune de ces étapes afin de mettre en évidence la phase avec laquelle elle interfère. Grâce à ce protocole, nous avons pu montrer que l'effet inhibiteur de la Monensine ne s'exerce que lorsqu'elle est présente au moment de la troisième étape de l'entrée, correspondant à l'endocytose et la fusion. Enfin, nos résultats ont également montré qu'un traitement par la Monensine n'a aucun effet sur le niveau d'expression de plusieurs facteurs cellulaires impliqués dans l'entrée du VHC, en l'occurrence SRB1, CD81, CLDN-1, OCLN et EGFR. Afin de compléter les expériences contrôles, l'effet de la Monensine sur la formation des complexes CD81-CLDN-1 sera aussi analysé.

De manière intéressante, il apparaît dans notre étude que l'étape d'attachement n'est pas altérée en présence de Monensine. Une étude décrit pourtant que l'expression du LDL-R, une molécule rapportée comme impliquée dans l'attachement aux cellules du VHC, est diminuée lors d'un traitement par la Monensine, en lien avec un blocage du recyclage de ce récepteur (Basu *et al.*, 1981). Même si dans cette étude les concentrations de Monensine utilisées sont très élevées (25µM), il serait intéressant de tester le niveau d'expression en surface du LDL-R dans nos cellules en présence de cette drogue, afin de voir s'il est modifié ou non. De cette manière, l'importance du LDL-R lors de l'attachement du virus pourrait être analysée. En effet, les études à ce sujet sont controversées, puisqu'une étude a par exemple rapporté que la réduction de l'expression du LDL-R par ARN interférence ne bloque pas l'attachement du VHC aux cellules (Jiang *et al.*, 2012). De plus, une étude du laboratoire a récemment montré que

la voie d'entrée médiée par le LDL-R serait plutôt une voie non-productive en terme d'infection (Albecka *et al.*, 2012).

#### **d) La Monensine agit sur le pH intracellulaire et bloque probablement l'étape de fusion**

Ayant démontré l'action de la Monensine sur une étape tardive de l'entrée virale, nous avons cherché à discriminer entre un effet sur l'endocytose ou sur la fusion des membranes virale et cellulaire dans les endosomes.

Pour cela, nous avons testé l'effet de la Monensine sur deux autres virus : l'Adénovirus de type 5 (AdV5) et le CVB4. L'entrée de l'AdV5 dans les cellules est, comme pour le VHC, dépendante de la clathrine. Le mécanisme d'entrée du CVB4 est moins bien connu, mais il est décrit qu'il est au moins partiellement dépendant de la clathrine. Nos tests d'infection par ces différents virus en présence de Monensine n'ont révélés aucun effet de la Monensine. Il semble alors que l'endocytose clathrine-dépendante ne soit pas affectée par la présence de Monensine. De manière intéressante, plusieurs travaux de la littérature ont rapporté que l'internalisation de différentes molécules n'était pas altérée par la Monensine, concluant que les effets attribués à la Monensine résultent de l'altération d'une étape plus tardive, lorsque les molécules en question sont déjà présentes dans des vésicules endocytiques telles que les endosomes (Marnell *et al.*, 1982; Whittaker *et al.*, 1986; Yanagishita & Hascall, 1985).

De manière intéressante, l'utilisation de différents virus et leur comparaison en terme de sensibilité à la Monensine a révélé que cette drogue bloque l'infection par des virus enveloppés (VHC, YFV, SinV) mais n'a aucun effet sur des virus non-enveloppés (AdV5, CVB4).

Puisque la Monensine ne semble pas affecter l'internalisation des particules virales, une hypothèse évidente serait qu'elle interfère avec la fusion. Cette étape étant dépendante du pH acide des endosomes, nous avons réalisé des expériences avec l'Acridine Orange, un composé qui fluoresce différemment en fonction de l'acidité des compartiments intracellulaires. Cette technique a notamment permis à Altan et collaborateurs de montrer l'alcalinisation de cellules tumorales mammaires en présence de Monensine (Altan *et al.*, 1998). De cette manière, nous avons pu observer une modification du marquage par l'Acridine Orange en présence de Monensine. En effet,

alors que ce composé s'accumule et fluoresce en rouge dans les compartiments intracellulaires acides des cellules non traitées, ce marquage disparaît complètement dans les cellules traitées avec 1  $\mu\text{M}$  de Monensine pendant 2 ou 24h. Le profil est intermédiaire dans le cas des cellules traitées avec une concentration de 0,1  $\mu\text{M}$  pendant 24h. Puisque l'effet de la Monensine sur l'alcalinisation des cellules est réversible en quelques minutes seulement (Maxfield, 1982) (résultats non montrés), il semble qu'après 24h d'incubation avec les cellules, la drogue ne soit plus totalement active. Nous avons donc mis en évidence une acidification des compartiments intracellulaires dans nos cellules en présence de Monensine. L'alcalinisation des endosomes précoces interfère probablement avec la fusion des membranes virale et cellulaire. Afin de définitivement confirmer cela, il sera nécessaire de réaliser des expériences complémentaires en présence de Monensine. Par exemple, des tests de fusion entre des VHCpp et des liposomes sont envisageables, tests qui se sont révélés efficaces dans la démonstration de la nécessité d'un pH acide pour la fusion (Lavillette *et al.*, 2006).

Les mécanismes mis en jeu lors de la fusion entre l'enveloppe du VHC et la membrane des endosomes ne sont pas précisément connus. Il a été largement décrit qu'il s'agit d'une étape dépendant du pH acide des endosomes (Lavillette *et al.*, 2006); (Blanchard *et al.*, 2006; Haid *et al.*, 2009; Koutsoudakis *et al.*, 2006; Meertens *et al.*, 2006; Tscherne *et al.*, 2006). En effet, ces études décrivent que des inhibiteurs de l'acidification des endosomes, tels que la Bafilomycine A1, la Concanamycine A ou le  $\text{NH}_4\text{Cl}$  bloquent la fusion. Notre étude confirme ces observations puisque la Monensine modifie le pH intracellulaire et inhibe l'entrée du VHC à une étape correspondant probablement à la fusion au sein des endosomes. D'ailleurs, dans nos expériences de marquages à l'Acridine Orange, nous avons montré un effet comparable de la Monensine, la Bafilomycine mais également du  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (résultats non montrés) sur l'alcalinisation des compartiments intracellulaires. Malgré une sensibilité des particules virales intracellulaires au pH acide des endosomes, il a été montré que les particules virales extracellulaires ne sont pas sensibles à un traitement par pH acide. Cela suggère que la sensibilité du virus au pH acide des endosomes pourrait être acquise après un changement conformationnel des glycoprotéines d'enveloppe probablement après interaction avec un facteur cellulaire. Dans ce sens, il a été récemment proposé que CD81 pourrait remplir cette fonction (Sharma *et al.*, 2011).

Entre autres, ces observations suggèrent que le VHC fusionne à la manière d'autres *Flavivirus*. D'ailleurs, il apparaît dans notre travail que l'infection par le YFV est aussi inhibée par la Monensine. Il serait alors intéressant de réaliser des cinétiques d'infection similaires à celles effectuées dans notre étude avec le YFV, de manière à déterminer si la Monensine affecte la même étape du cycle infectieux chez ces deux *Flaviviridae*.

#### **e) La Monensine inhibe la transmission du virus de cellule à cellule**

L'importance de la transmission directe du virus d'une cellule infectée vers une cellule non-infectée par un contact entre les deux cellules a été évoquée à plusieurs reprises précédemment. Nous avons donc testé expérimentalement si la Monensine pouvait empêcher cette voie de transmission. Pour cela, les cellules ont été infectées par des VHCcc en l'absence de Monensine, de manière à permettre l'entrée du virus. Ensuite, afin de voir si le virus était transmis entre des cellules adjacentes et donc si des foci de cellules infectées étaient formés, le virus a été enlevé, les cellules lavées puis incubées 48h en présence d'anticorps neutralisants afin de bloquer la voie d'infection médiée par les particules libres dans le milieu extracellulaire. Finalement, des expériences d'immunofluorescence ont permis de révéler les cellules infectées et la taille des foci a été évaluée. Ainsi, nous avons pu mettre en évidence une réduction significative de la transmission de cellule à cellule du VHC en présence de Monensine.

Cette information concoure à améliorer la connaissance des mécanismes mis en jeu au cours du passage du VHC de cellule à cellule, mode de transmission encore mal décrit. En effet, notre travail révèle que le pH acide intracellulaire est nécessaire au deux voies d'entrée du VHC dans les cellules.

#### **f) L'effet additif de la Monensine et l'IFN**

Pour terminer, nous avons souhaité tester les effets conjugués de la Monensine et d'un inhibiteur connu de l'infection par le VHC : l'IFN. Pour cela, les cellules ont été infectées en présence de 0,04  $\mu$ M de Monensine, 1 U/ml d'IFN ou une combinaison des deux. Les concentrations des conditions simples ont été choisies après le calcul de la concentration permettant 50% d'inhibition de l'infection par les VHCcc.

Grâce à cela, nous avons pu montrer que la combinaison des deux inhibiteurs produit un effet additif, puisque environ 70% de l'infection est inhibée dans cette condition. Cette observation semble logique puisque la Monensine et l'IFN impliquent des effets très différents sur l'infection par le VHC.

### **g) Conclusion de cette étude**

Etant donné l'ensemble des résultats de ce travail et notamment le caractère additif des effets combinés de la Monensine et l'IFN, la question d'une utilisation potentielle de la Monensine en thérapie se pose. Malheureusement, quatre cas d'empoisonnement par la Monensine chez l'Homme ont été décrits. Les deux premiers datent de 1999 et ont été publiés dans une revue non-scientifique, tandis que deux articles scientifiques ont chacun décrit un nouveau cas de décès suite à l'ingestion accidentelle de Monensine en 2001 (Caldeira *et al.*, 2001; Kouyoumdjian *et al.*, 2001). Dans ces deux publications, il a été rapporté que la prise de Monensine a entraîné une rhabdomyolyse, c'est-à-dire une altération des muscles squelettiques, puis une insuffisance rénale menant au décès. La quantité ingérée était inconnue dans l'étude de Kouyoumdjian et collaborateurs, mais évaluée à trois fois la dose létale pour les bovins dans l'étude de Caldeira et collaborateurs. En effet, des surdoses de Monensine entraînent également des problèmes chez les animaux, les chevaux étant les plus sensibles à la prise de Monensine. Ainsi, il semble que la Monensine soit une molécule à délivrer avec précautions chez les animaux. Egalement aux vues de ces effets indésirables à forte dose chez l'Homme, il est exclu de l'envisager à des fins thérapeutiques.

Toutefois, puisque la Monensine présente un effet inhibiteur de l'infection par le VHC, il pourrait être intéressant de rechercher des composés structurellement proches afin d'en sélectionner un non-toxique pour l'Homme et mimant l'effet de la Monensine sur l'infection. A plus court terme, la Monensine pourrait se révéler utile dans l'étude de la fusion membranaire dans le cas de l'infection par le VHC, mais également pour l'étude de tout autre mécanisme, cellulaire ou pathologique, dépendant du pH des compartiments intracellulaires. Concernant l'étude de l'entrée du VHC, nous prévoyons d'ailleurs de générer des mutants de résistance à la Monensine, puis d'identifier les

mutations d'adaptation impliquées dans ce phénotype de résistance. Ainsi, nous espérons améliorer la compréhension de l'entrée du VHC et plus particulièrement de l'étape de fusion.

## **S) BIBLIOGRAPHIE**

- Abbate, I., Iacono, Lo, O., Di Stefano, R., Cappiello, G., Girardi, E., Longo, R., Ferraro, D., Antonucci, G., Di Marco, V., & other authors. (2004).** HVR-1 quasispecies modifications occur early and are correlated to initial but not sustained response in HCV-infected patients treated with pegylated- or standard-interferon and ribavirin. *Journal of Hepatology* **40**, 831–836.
- Aberle, J. H., Formann, E., Steindl-Munda, P., Weseslindtner, L., Gurguta, C., Perstinger, G., Grilnberger, E., Laferl, H., Dienes, H. P., & other authors. (2006).** Prospective study of viral clearance and CD4(+) T-cell response in acute hepatitis C primary infection and reinfection. *J Clin Virol* **36**, 24–31.
- Adovelande, J. & Schrével, J. (1996).** Carboxylic ionophores in malaria chemotherapy: the effects of monensin and nigericin on *Plasmodium falciparum* in vitro and *Plasmodium vinckei petteri* in vivo. *Life Sci* **59**, PL309–PL315.
- Agnello, V., Abel, G., Elfahal, M., Knight, G. B. & Zhang, Q. X. (1999).** Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 12766–12771.
- Agtarap, A. & Chamberlin, J. W. (1967).** Monensin, a new biologically active compound. IV. Chemistry. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **7**, 359-362
- Akazawa, D., Date, T., Morikawa, K., Murayama, A., Miyamoto, M., Kaga, M., Barth, H., Baumert, T. F., Dubuisson, J. & Wakita, T. (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., Montserret, R., Krey, T., Tarr, A. W., Diesis, E., Ball, J. K., Descamps, V., Duvet, S., Rey, F., & other authors. (2011).** Identification of New Functional Regions in Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein E2. *Journal of Virology* **85**, 1777–1792.
- Albecka, A., Belouzard, S., de Beeck, A. O., Descamps, V., Goueslain, L., Bertrand-Michel, J., Tercé, F., Duverlie, G., Rouillé, Y. & Dubuisson, J. (2012).** Role of low-density lipoprotein receptor in the hepatitis C virus life cycle. *hepatology* **55**, 998–1007.
- Alsaleh, K., Delavalle, P.-Y., Pillez, A., Duverlie, G., Descamps, V., Rouillé, Y., Dubuisson, J. & Wychowski, C. (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
- Altan, N., Chen, Y., Schindler, M. & Simon, S. M. (1998).** Defective Acidification in Human Breast Tumor Cells and Implications for Chemotherapy. *J Exp Med* **187**, 1583. The Rockefeller University Press.
- Alter, H. J., Purcell, R. H., Holland, P. V. & Popper, H. (1978).** Transmissible agent in non-A, non-B hepatitis. *Lancet*. **4**, 459-463
- Alter, M. J. (2007).** Epidemiology of hepatitis C virus infection. *WJG* **13**, 2436–2441.
- Alzahrani, A. J. (2008).** Simultaneous detection of hepatitis C virus core antigen and antibodies in Saudi drug users using a novel assay. *Journal of Medical Virology* **80**, 603–606.
- Andre, P., Komurian-Pradel, F., Deforges, S., Perret, M., Berland, J. L., Sodoyer, M., Pol, S., Brechot, C., Paranhos-Baccala, G. & Lotteau, V. (2002).** Characterization of Low- and Very-Low-Density Hepatitis C Virus RNA-Containing Particles. *Journal of Virology* **76**, 6919–6928.
- Andréo, U., Maillard, P., Kalinina, O., Walic, M., Meurs, E., Martinot, M., Marcellin, P. & Budkowska, A. (2007).** Lipoprotein lipase mediates hepatitis C virus (HCV) cell entry and inhibits HCV infection. *Cell Microbiol* **9**, 2445–2456.

- Andria, M. L., Barsh, G. S. & Levy, S. (1992).** Expression of TAPA-1 in preimplantation mouse embryos. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **186**, 1201–1206.
- Appel, N., Pietschmann, T. & Bartenschlager, R. (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. American Society for Microbiology (ASM).
- Appel, N., Zayas, M., Miller, S., Krijnse-Locker, J., Schaller, T., Friebe, P., Kallis, S., Engel, U. & Bartenschlager, R. (2008).** Essential Role of Domain III of Nonstructural Protein 5A for Hepatitis C Virus Infectious Particle Assembly. *PLoS Pathogens* **4**, e1000035.
- Arduise, C., Abache, T., Li, L., Billard, M., Chabanon, A., Ludwig, A., Mauduit, P., Boucheix, C., Rubinstein, E. & Le Naour, F. (2008).** Tetraspanins Regulate ADAM10-Mediated Cleavage of TNF- $\alpha$  and Epidermal Growth Factor. *The Journal of Immunology*. **181**, 7002-7013.
- Ascione, A., Tartaglione, M. T. & Giuseppe Di Costanzo, G. (2007).** Natural history of chronic hepatitis C virus infection. *Nature Cell Biology* **39**, S4–S7.
- Balzarini, J. (2007).** Targeting the glycans of glycoproteins: a novel paradigm for antiviral therapy. *Nat Rev Micro* **5**, 583–597. Nature Publishing Group.
- Barreiro, O., Zamai, M., Yanez-Mo, M., Tejera, E., Lopez-Romero, P., Monk, P. N., Gratton, E., Caiolfa, V. R. & Sanchez-Madrid, F. (2008).** Endothelial adhesion receptors are recruited to adherent leukocytes by inclusion in preformed tetraspanin nanoplateforms. *The Journal of Cell Biology* **183**, 527–542.
- Bartenschlager, R., Lohmann, V., Wilkinson, T. & Koch, J. O. (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. American Society for Microbiology (ASM).
- Bartenschlager, R. R., Frese, M. M. & Pietschmann, T. T. (2004).** Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence. *Adv Virus Res* **63**, 71–180.
- Bartenschlager, R., Kaul, A. & Sparacio, S. (2003).** Replication of the hepatitis C virus in cell culture. *Antiviral Research* **60**, 91–102.
- Bartenschlager, R., Penin, F., Lohmann, V. & André, P. (2011).** Assembly of infectious hepatitis C particles. *Trends in Microbiology*. **19** (2), 95-103.
- Barth, H., Schäfer, C., Adah, M. I., Zhang, F., Linhard, R. J., Toyoda, H., Kinoshita-Toyoda, A., Toida, T., van Kuppevelt, T. H., & other authors. (2003).** Cellular Binding of Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein E2 Requires Cell Surface Heparan Sulfate. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 41003–41012.
- Barth, H., Schnober, E. K., Zhang, F., Linhard, R. J., Depla, E., Boson, B., Cosset, F. L., Patel, A. H., Blum, H. E. & Baumert, T. F. (2006).** Viral and Cellular Determinants of the Hepatitis C Virus Envelope-Heparan Sulfate Interaction. *Journal of Virology* **80**, 10579–10590. American Society for Microbiology (ASM).
- Bartosch, B., Vitelli, A., Granier, C., Goujon, C., Dubuisson, J., Pascale, S., Scarselli, E., Cortese, R., Nicosia, A. & Cosset, F. L. (2003a).** Cell Entry of Hepatitis C Virus Requires a Set of Co-receptors That Include the CD81 Tetraspanin and the SR-B1 Scavenger Receptor. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 41624–41630.

- Bartosch, B., Bukh, J., Meunier, J.-C., Granier, C., Engle, R. E., Blackwelder, W. C., Emerson, S. U., Cosset, F.-L. & Purcell, R. H. (2003b).** In vitro assay for neutralizing antibody to hepatitis C virus: Evidence for broadly conserved neutralization epitopes. *PNAS*. **100**, 14199–14204
- Bartosch, B., Dubuisson, J. & Cosset, F.-L. (2003c).** Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J Exp Med* **197**, 633–642.
- Bartosch, B., Verney, G., Dreux, M., Donot, P. G., Morice, Y., Penin, F., Pawlotsky, J.-M., Lavillette, D. & Cosset, F.-L. (2005).** An Interplay between Hypervariable Region 1 of the Hepatitis C Virus E2 Glycoprotein, the Scavenger Receptor BI, and High-Density Lipoprotein Promotes both Enhancement of Infection and Protection against Neutralizing Antibodies. *Journal of Virology*. **79**, 8217–8229
- Bassett, S. (2001).** Protective immune response to hepatitis C virus in chimpanzees rechallenged following clearance of primary infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **33**, 1479–1487.
- Bassett, S., Brasky, K. M. & Lanford, R. E. (1998).** Analysis of Hepatitis C Virus-Inoculated Chimpanzees Reveals Unexpected Clinical Profiles. *Journal of Virology* **72**, 2589. American Society for Microbiology (ASM).
- Bassett, S., Thomas, D. L., Brasky, K. M. & Lanford, R. E. (1999).** Viral Persistence, Antibody to E1 and E2, and Hypervariable Region 1 Sequence Stability in Hepatitis C Virus-Inoculated Chimpanzees. *Journal of Virology* **73**, 1118. American Society for Microbiology (ASM).
- Basu, A., Kanda, T., Beyene, A., Saito, K., Meyer, K. & Ray, R. (2007).** Sulfated Homologues of Heparin Inhibit Hepatitis C Virus Entry into Mammalian Cells. *Journal of Virology* **81**, 3933–3941. American Society for Microbiology (ASM).
- Basu, S. K., Goldstein, J. L., Anderson, R. G. W. & Brown, M. S. (1981).** Monensin interrupts the recycling of low density lipoprotein receptors in human fibroblasts. *Cell* **24**, 493–502.
- Baumert, T., Ito, M., Wong, D. T. & Liang, T. J. (1998).** Hepatitis C Virus Structural Proteins Assemble into Viruslike Particles in Insect Cells. *Journal of Virology* **72**, 3827. American Society for Microbiology (ASM).
- Behrens, S. E., Tomei, L. & De Francesco, R. (1996).** Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *EMBO J* **15**, 12–22. Nature Publishing Group.
- Belon, C. A. C. & Frick, D. N. D. (2009).** Fuel specificity of the hepatitis C virus NS3 helicase. *Journal of Molecular Biology* **388**, 851–864.
- Benedicto, I., Molina-Jimenez, F., Barreiro, O., Maldonado Rodríguez, A., Prieto, J., Moreno-Otero, R., Aldabe, R., Lopez-Cabrera, M. & Majano, P. L. (2008).** Hepatitis C virus envelope components alter localization of hepatocyte tight junction-associated proteins and promote occludin retention in the endoplasmic reticulum. *hepatology* **48**, 1044–1053. Wiley Online Library.
- Benedicto, I., Molina-Jimenez, F., Bartosch, B., Cosset, F. L., Lavillette, D., Prieto, J., Moreno-Otero, R., Valenzuela-Fernandez, A., Aldabe, R., & other authors. (2009).** The Tight Junction-Associated Protein Occludin Is Required for a Postbinding Step in Hepatitis C Virus Entry and Infection. *Journal of Virology* **83**, 8012–8020.

- Benedicto, I., Molina-Jimenez, F., García-Buey, L., Gondar, V., Lopez-Cabrera, M., Moreno-Otero, R. & Majano, P. L. (2012).** Role of tight junctions in hepatitis C virus infection. *Revista Espanola de Enfermedades Digestivas* **2012**, 255–263. SciELO Espana.
- Benga, W. J. A., Krieger, S. E., Dimitrova, M., Zeisel, M. B., Parnot, M., Lupberger, J., Hildt, E., Luo, G., McLauchlan, J., & other authors. (2010).** Apolipoprotein E interacts with hepatitis C virus nonstructural protein 5A and determines assembly of infectious particles. *hepatology* **51**, 43–53.
- Beran, R. K. F., Serebrov, V. & Pyle, A. M. (2007).** The Serine Protease Domain of Hepatitis C Viral NS3 Activates RNA Helicase Activity by Promoting the Binding of RNA Substrate. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 34913–34920.
- Berditchevski, F. (2001).** Analysis of the CD151middle dotalpha 3beta 1 Integrin and CD151middle dotTetraspanin Interactions by Mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 41165–41174.
- Berditchevski, F. (2002).** Expression of the Palmitoylation-deficient CD151 Weakens the Association of alpha 3beta 1 Integrin with the Tetraspanin-enriched Microdomains and Affects Integrin-dependent Signaling. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 36991–37000.
- Berditchevski, F. & Odintsova, E. (2007).** Tetraspanins as regulators of protein trafficking. *Traffic* **8**, 89–96.
- Berg, T., Blomhoff, R., Naess, L., Tolleshaug, H. & Drevon, C. A. (1983).** Monensin inhibits receptor-mediated endocytosis of asialoglycoproteins in rat hepatocytes. *Experimental Cell Research*. **148**, 319-330.
- Bertaux, C., Daelemans, D., Meertens, L., Cormier, E. G., Reinus, J. F., Peumans, W. J., Van Damme, E. J. M., Igarashi, Y., Oki, T., & other authors. (2007).** Entry of hepatitis C virus and human immunodeficiency virus is selectively inhibited by carbohydrate-binding agents but not by polyanions. *Virology* **366**, 40–50.
- Bertaux, C. & Dragic, T. (2006).** Different domains of CD81 mediate distinct stages of hepatitis C virus pseudoparticle entry. **80**, 4940–4948
- Bienstock, R. J. & Barrett, J. C. (2001).** KAI1, A prostate metastasis suppressor: Prediction of solvated structure and interactions with binding partners; integrins, cadherins, and cell-surface receptor proteins. *Molecular Carcinogenesis* **32**, 139–153.
- Bissig, K. D., Wieland, S. F., Tran, P., Isogawa, M., Le, T. T., Chisari, F. V. & Verma, I. M. (2010).** Human liver chimeric mice provide a model for hepatitis B and C virus infection and treatment. *Journal of Clinical Investigation* **120**, 924. American Society for Clinical Investigation.
- Bitzegeio, J., Bankwitz, D., Hueging, K., Haid, S., Brohm, C., Zeisel, M. B., Herrmann, E., Iken, M., Ott, M., & other authors. (2010).** Adaptation of Hepatitis C Virus to Mouse CD81 Permits Infection of Mouse Cells in the Absence of Human Entry Factors. *PLoS Pathogens* **6**, e1000978 (M. S. Diamond, Ed.). Public Library of Science.
- Blanchard, E., Belouzard, S., Goueslain, L., Wakita, T., Dubuisson, J., Wychowski, C. & Rouille, Y. (2006).** Hepatitis C Virus Entry Depends on Clathrin-Mediated Endocytosis. *Journal of Virology* **80**, 6964–6972.
- Blanchard, E., Brand, D., Trassard, S., Goudeau, A. & Roingeard, P. (2002).** Hepatitis C Virus-Like Particle Morphogenesis. *Journal of Virology* **76**, 4073–4079.
- Blight, K. J., Kolykhalov, A. A. & Rice, C. M. (2000).** Efficient Initiation of HCV RNA Replication in Cell Culture. *Science* **290**, 1972–1974.

- Bode, J. G., Ludwig, S., Ehrhardt, C., Erhardt, A., Albrecht, U., Schaper, F., Heinrich, P. C. & Häussinger, D. (2003).** IFN- $\alpha$  antagonistic activity of HCV core protein involves induction of suppressor of cytokine signaling-3. *The FASEB Journal*. **10**.
- Boo, I., teWierik, K., Douam, F., Lavillette, D., Pombourios, P. & Drummer, H. E. (2012).** Distinct roles in folding, CD81 receptor binding and viral entry for conserved histidine residues of hepatitis C virus glycoprotein E1 and E2. *Biochem J* **443**, 85–94.
- Bosch, B., Grigorov, B., Senserrich, J., Clotet, B., Darlix, J. L., Muriaux, D. & Este, J. (2008).** A clathrin–dynamin-dependent endocytic pathway for the uptake of HIV-1 by direct T cell–T cell transmission. *Antiviral Research* **80**, 185–193.
- Boson, B., Granio, O., Bartenschlager, R. & Cosset, F.-L. (2011).** A Concerted Action of Hepatitis C Virus P7 and Nonstructural Protein 2 Regulates Core Localization at the Endoplasmic Reticulum and Virus Assembly. *PLoS Pathogens* **7**, e1002144 (A. Pekosz, Ed.). Public Library of Science.
- Boucheix, C., Benoit, P., Frachet, P., Billard, M., Worthington, R. E., Gagnon, J. & Uzan, G. (1991).** Molecular cloning of the CD9 antigen. A new family of cell surface proteins. *J Biol Chem* **266**, 117–122.
- Boucheix, C. & Rubinstein, E. (2001).** Tetraspanins. *Cellular and Molecular Life Sciences*. **58**, 1189–1205
- Boulant, S. S., Douglas, M. W. M., Moody, L. L., Budkowska, A. A., Targett-Adams, P. P. & McLauchlan, J. J. (2008).** Hepatitis C virus core protein induces lipid droplet redistribution in a microtubule- and dynein-dependent manner. *Traffic* **9**, 1268–1282.
- Boulant, S., Becchi, M., Penin, F. & Lavergne, J.-P. (2003).** Unusual multiple recoding events leading to alternative forms of hepatitis C virus core protein from genotype 1b. *J Biol Chem* **278**, 45785–45792.
- Boulant, S., Montserret, R., Hope, R. G., Ratinier, M., Targett-Adams, P., Lavergne, J.-P., Penin, F. & McLauchlan, J. (2006).** Structural Determinants That Target the Hepatitis C Virus Core Protein to Lipid Droplets. *Journal of Biological Chemistry*.
- Bourgeois, R., Mercier, J., Paquette-Brooks, I. & Cohen, É. A. (2006).** Association between disruption of CD4 receptor dimerization and increased human immunodeficiency virus type 1 entry. *Retrovirology* **3**, 31. BioMed Central Ltd.
- Bowen, D. G. & Walker, C. M. (2005).** Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection. *Nature Cell Biology* **436**, 946–952. Nature Publishing Group.
- Branch, A. D., Stump, D. D., Gutierrez, J. A., Eng, F. & Walewski, J. L. (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., Bieck, E., Montserret, R., Wölk, B., Hellings, J. A., Blum, H. E., Penin, F. & Moradpour, D. (2002).** An Amino-terminal Amphipathic  $\alpha$ -Helix Mediates Membrane Association of the Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5A. *J Biol Chem*. **227**, 8130–8139.
- Brazzoli, M., Bianchi, A., Filippini, S., Weiner, A., Zhu, Q., Pizza, M. & Crotta, S. (2008).** CD81 Is a Central Regulator of Cellular Events Required for Hepatitis C Virus Infection of Human Hepatocytes. *Journal of Virology* **82**, 8316–8329.

- Brazzoli, M., Helenius, A., Fong, S. K. H., Houghton, M., Abrignani, S. & Merola, M. (2005).** Folding and dimerization of hepatitis C virus E1 and E2 glycoproteins in stably transfected CHO cells. *Virology* **332**, 438–453.
- Breiman, A., Grandvaux, N., Lin, R., Ottone, C., Akira, S., Yoneyama, M., Fujita, T., Hiscott, J. & Meurs, E. F. (2005).** Inhibition of RIG-I-Dependent Signaling to the Interferon Pathway during Hepatitis C Virus Expression and Restoration of Signaling by IKK $\epsilon$ . *Journal of Virology*. **79**, 3969–3978.
- Brenndörfer, E. D. & Sällberg, M. (2012).** Hepatitis C Virus-Mediated Modulation of Cellular Immunity. *Arch Immunol Ther Exp*.
- Bressanelli, S., Tomei, L., Rousset, A., Incitti, I., Vitale, R. L., Mathieu, M., De Francesco, R. & Rey, F. A. (1999).** Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *PNAS* **96**, 13034. National Academy of Sciences.
- Brimacombe, C. L., Grove, J., Meredith, L. W., Hu, K., Syder, A. J., Flores, M. V., Timpe, J. M., Krieger, S. E., Baumert, T. F., & other authors. (2011).** Neutralizing Antibody-Resistant Hepatitis C Virus Cell-to-Cell Transmission. *Journal of Virology* **85**, 596–605.
- Brohm, C., Steinmann, E., Friesland, M., Lorenz, I. C., Patel, A., Penin, F., Bartenschlager, R. & Pietschmann, T. (2009).** Characterization of Determinants Important for Hepatitis C Virus p7 Function in Morphogenesis by Using trans-Complementation. *Journal of Virology* **83**, 11682–11693. American Society for Microbiology (ASM).
- Buck, M. (2008).** Direct Infection and Replication of Naturally Occurring Hepatitis C Virus Genotypes 1, 2, 3 and 4 in Normal Human Hepatocyte Cultures. *PLoS ONE* **3**, e2660 (O. Schwartz, Ed.). Public Library of Science.
- Bukh, J. (2012).** Animal Models for the Study of Hepatitis C Virus Infection and Related Liver Disease. *Trends in Cell Biology* **142**, 1279–1287.e3.
- Bukh, J., Thimme, R., Meunier, J.-C., Faulk, K., Spangenberg, H. C., Chang, K.-M., Satterfield, W., Chisari, F. V. & Purcell, R. H. (2008).** Previously Infected Chimpanzees Are Not Consistently Protected against Reinfection or Persistent Infection after Reexposure to the Identical Hepatitis C Virus Strain. *Journal of Virology*. **82**, 8183–8195.
- Buonocore, L., Blight, K. J., Rice, C. M. & Rose, J. K. (2002).** Characterization of Vesicular Stomatitis Virus Recombinants That Express and Incorporate High Levels of Hepatitis C Virus Glycoproteins. *Journal of Virology* **76**, 6865–6872.
- Cai, Z., Cai, L., Jiang, J., Chang, K. S., van der Westhuyzen, D. R. & Luo, G. (2007).** Human Serum Amyloid A Protein Inhibits Hepatitis C Virus Entry into Cells. *Journal of Virology* **81**, 6128–6133. American Society for Microbiology (ASM).
- Caldeira, C., Neves, W. S., Cury, P. M., Serrano, P., Baptista, M. A. S. F. & Burdmann, E. A. (2001).** Rhabdomyolysis, acute renal failure, and death after monensin ingestion. *American Journal of Kidney Diseases* **38**, 1108–1112.
- 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**, 720–729.
- Callens, N. N., Ciczora, Y. Y., Bartosch, B. B., Vu-Dac, N. N., Cosset, F.-L. F., Pawlotsky, J.-M. J., Penin, F. F. & Dubuisson, J. J. (2005).** Basic residues in hypervariable region 1 of hepatitis C virus envelope glycoprotein e2 contribute to virus entry. *Journal of Virology* **79**, 15331–15341.

- Cannon, K. S. & Cresswell, P. (2001).** Quality control of transmembrane domain assembly in the tetraspanin CD82. *EMBO J* **20**, 2443–2453. Nature Publishing Group.
- Carman, C. V. (2011).** Overview: Imaging in the Study of Integrins. *Methods in Molecular Biology* **757**, 159–189.
- Carrère-Kremer, S., Montpellier, C., Lorenzo, L., Brulin, B., Cocquerel, L., Belouzard, S., Penin, F. & Dubuisson, J. (2004).** Regulation of Hepatitis C Virus Polyprotein Processing by Signal Peptidase Involves Structural Determinants at the p7 Sequence Junctions. *J Biol Chem* **279**, 41384–41392.
- Carrère-Kremer, S., Montpellier-Pala, C., Cocquerel, L., Wychowski, C., Penin, F. & Dubuisson, J. (2002).** Subcellular Localization and Topology of the p7 Polypeptide of Hepatitis C Virus. *Journal of Virology* **76**, 3720–3730.
- Castello, G., Scala, S., Palmieri, G., Curley, S. A. & Izzo, F. (2010).** HCV-related hepatocellular carcinoma: From chronic inflammation to cancer. *hepatology* **134**, 237–250.
- Catanese, M. T., Ansuini, H., Graziani, R., Huby, T., Moreau, M., Ball, J. K., Paonessa, G., Rice, C. M., Cortese, R., & other authors. (2010).** Role of Scavenger Receptor Class B Type I in Hepatitis C Virus Entry: Kinetics and Molecular Determinants. *Journal of Virology* **84**, 34–43. American Society for Microbiology (ASM).
- Catanese, M. T., Graziani, R., Hahn, von, T., Moreau, M., Huby, T., Paonessa, G., Santini, C., Luzzago, A., Rice, C. M., & other authors. (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.
- Chambrion, C. & Le Naour, F. (2010).** The Tetraspanins CD9 and CD81 Regulate CD9P1-Induced Effects on Cell Migration. *PLoS ONE* **5**, e11219 (G. Dalmaso, Ed.). Public Library of Science.
- Chang, K. S., Jiang, J., Cai, Z. & Luo, G. (2007).** Human Apolipoprotein E Is Required for Infectivity and Production of Hepatitis C Virus in Cell Culture. *Journal of Virology* **81**, 13783–13793.
- Chapman, H. D., Jeffers, T. K. & Williams, R. B. (2010).** Forty years of monensin for the control of coccidiosis in poultry. *Poultry Science* **89**, 1788–1801.
- Charrin, S., Le Naour, F., Oualid, M., Billard, M., Faure, G., Hanash, S. M., Boucheix, C. & Rubinstein, E. (2001).** The major CD9 and CD81 molecular partner. Identification and characterization of the complexes. *J Biol Chem* **276**, 14329–14337.
- Charrin, S., Yalaoui, S., Bartosch, B., Cocquerel, L., Franetich, J. F., Boucheix, C., Mazier, D., Rubinstein, E. & Silvie, O. (2009a).** The Ig Domain Protein CD9P-1 Down-regulates CD81 Ability to Support Plasmodium yoelii Infection. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 31572–31578.
- Charrin, S., Le Naour, F. & Labas, V. (2003a).** EWI-2 is a new component of the tetraspanin web in hepatocytes and lymphoid cells. *Biochem J* **373**, 409–421.
- Charrin, S., Le Naour, F., Silvie, O., Milhiet, P. E., Boucheix, C. & Rubinstein, E. (2009b).** Lateral organization of membrane proteins: tetraspanins spin their web. *Biochem J* **420**, 133–154.
- Charrin, S., Manié, S., Billard, M., Ashman, L., Gerlier, D., Boucheix, C. & Rubinstein, E. (2003b).** Multiple levels of interactions within the tetraspanin web. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **304**, 107–112.
- Charrin, S., Manié, S., Oualid, M., Billard, M., Boucheix, C. & Rubinstein, E. (2002).** Differential stability of tetraspanin/tetraspanin interactions: role of palmitoylation. *FEBS LETTERS* **516**, 139–144.

- Charrin, S., Manié, S., Thiele, C., Billard, M., Gerlier, D., Boucheix, C. & Rubinstein, E. (2003c).** A physical and functional link between cholesterol and tetraspanins. *Eur J Immunol* **33**, 2479–2489.
- Chatel-Chaix, L., Melancon, P., Racine, M. E., Baril, M. & Lamarre, D. (2011).** Y-Box-Binding Protein 1 Interacts with Hepatitis C Virus NS3/4A and Influences the Equilibrium between Viral RNA Replication and Infectious Particle Production. *Trends in Cell Biology* **85**, 11022–11037.
- Chatterji, U., Bobardt, M. D., Lim, P. & Gallay, P. A. (2010).** Cyclophilin A-independent recruitment of NS5A and NS5B into hepatitis C virus replication complexes. *Journal of General Virology* **91**, 1189–1193.
- Chayama, K., Takahashi, S., Toyota, J., Karino, Y., Ikeda, K., Ishikawa, H., Watanabe, H., McPhee, F., Hughes, E. & Kumada, H. (2011).** Dual therapy with the nonstructural protein 5A inhibitor, daclatasvir, and the nonstructural protein 3 protease inhibitor, asunaprevir, in hepatitis C virus genotype 1b-infected null responders. *hepatology* **55**, 742–748.
- Chen, H., Dziuba, N., Friedrich, B., Lindern, J. V., Murray, J. L., Rojo, D. R., Hodge, T. W., O'Brien, W. A. & Ferguson, M. R. (2008).** A critical role for CD63 in HIV replication and infection of macrophages and cell lines. *Virology* **379**, 191–196. NIH Public Access.
- Chen, S. L. & Morgan, T. R. (2006).** The Natural History of Hepatitis C Virus (HCV) Infection. *Trends in Cell Biology* **3**, 47. Ivyspring International Publisher.
- Chen, Y., Maguire, T., Hileman, R. E., Fromm, J. R., Esko, J. D., Linhard, R. J. & Marks, R. M. (1997).** Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nature Medicine*. **3**, 866-871.
- Cheng, G., Zhong, J. & Chisari, F. V. (2006).** Inhibition of dsRNA-induced signaling in hepatitis C virus-infected cells by NS3 protease-dependent and -independent mechanisms. *PNAS* **103**, 8499–8504. National Academy of Sciences.
- Chertova, E., Chertov, O., Coren, L. V., Roser, J. D., Trubey, C. M., Bess, J. W., Sowder, R. C., Barsov, E., Hood, B. L., & other authors. (2006).** Proteomic and Biochemical Analysis of Purified Human Immunodeficiency Virus Type 1 Produced from Infected Monocyte-Derived Macrophages. *Journal of Virology* **80**, 9039–9052. American Society for Microbiology (ASM).
- Chevaliez, S. & Pawlotsky, J. M. (2007).** Hepatitis C virus: virology, diagnosis and management of antiviral therapy. *WJG* **13**, 2461.
- Choi, S. H., Kim, S. Y., Park, K. J., Kim, Y. J. & Hwang, S. B. (2004).** Hepatitis C virus core protein is efficiently released into the culture medium in insect cells. *J Biochem Mol Biol* **37**, 735–740.
- Choo, Q. L., Kuo, G., Ralston, R., Weiner, A., Chien, D., Van Nest, G., Han, J., Berger, K., Thudium, K. & Kuo, C. (1994).** Vaccination of chimpanzees against infection by the hepatitis C virus. *PNAS*. **91**, 1294-1298.
- Choo, Q. L., Kuo, G., Weiner, A. J., Overby, L. R., Bradley, D. W. & Houghton, M. M. (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., Richman, K. H., Han, J. H., Berger, K., Lee, C., Dong, C., Gallegos, C., Coit, D., Medina-Selby, R. & Barr, P. J. (1991).** Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc Nat Acad Sct USA*. **88**, 2451-2455.

- Ciczora, Y., Callens, N., Penin, F., Pécheur, E. I. & Dubuisson, J. (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.
- Ciczora, Y., Callens, N., Montpellier, C., Bartosch, B., Cosset, F.-L., Op de Beeck, A. & Dubuisson, J. (2005).** Contribution of the charged residues of hepatitis C virus glycoprotein E2 transmembrane domain to the functions of the E1E2 heterodimer. *J Gen Virol* **86**, 2793–2798.
- Ciesek, S., Westhaus, S., Wicht, M., Wappler, I., Henschen, S., Sarrazin, C., Hamdi, N., Abdelaziz, A. I., Strassburg, C. P., & other authors. (2011a).** Impact of Intra- and Interspecies Variation of Occludin on Its Function as Coreceptor for Authentic Hepatitis C Virus Particles. *Journal of Virology* **85**, 7613–7621. American Society for Microbiology (ASM).
- Ciesek, S. S., Hahn, von, T. T., Colpitts, C. C. C., Schang, L. M. L., Friesland, M. M., Steinmann, J. J., Manns, M. P. M., Ott, M. M., Wedemeyer, H. H., & other authors. (2011b).** The green tea polyphenol, epigallocatechin-3-gallate, inhibits hepatitis C virus entry. *hepatology* **54**, 1947–1955.
- Claas, C., Stipp, C. S. & Hemler, M. E. (2001).** Evaluation of Prototype Transmembrane 4 Superfamily Protein Complexes and Their Relation to Lipid Rafts. *J Biol Chem* **276**, 7974–7984.
- Clark, K. L. (2004).** CD81 Associates with 14-3-3 in a Redox-regulated Palmitoylation-dependent Manner. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 19401–19406.
- Clark, K. L., Zeng, Z., Langford, A. L., Bowen, S. M. & Todd, S. C. (2001).** PGRL is a major CD81-associated protein on lymphocytes and distinguishes a new family of cell surface proteins. *J Immunol* **167**, 5115–5121.
- Clayson, E. T., Brando, L. V. & Compans, R. W. (2003).** Release of simian virus 40 virions from epithelial cells is polarized and occurs without cell lysis. *Journal of Virology* **63**, 2278–2288.
- Clayton, R. F., Owsianka, A., Aitken, J., Graham, S., Bhella, D. & Patel, A. H. (2002).** Analysis of Antigenicity and Topology of E2 Glycoprotein Present on Recombinant Hepatitis C Virus-Like Particles. *Journal of Virology* **76**, 7672–7682. American Society for Microbiology (ASM).
- Cocquerel, L., Duvet, S., Meunier, J. C., Pillez, A., Cacan, R., Wychowski, C. & Dubuisson, J. (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. American Society for Microbiology (ASM).
- Cocquerel, L., Kuo, C. C., Dubuisson, J. & Levy, S. (2003a).** CD81-Dependent Binding of Hepatitis C Virus E1E2 Heterodimers. *Journal of Virology* **77**, 10677–10683.
- Cocquerel, L., Meunier, J. C., Pillez, A., Wychowski, C. & Dubuisson, J. (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., Quinn, E. R., Flint, M., Hadlock, K. G., Fong, S. K. H. & Levy, S. (2003b).** Recognition of Native Hepatitis C Virus E1E2 Heterodimers by a Human Monoclonal Antibody. *Journal of Virology* **77**, 1604–1609.
- Cocquerel, L., Voisset, C. & Dubuisson, J. (2006).** Hepatitis C virus entry: potential receptors and their biological functions. *Journal of General Virology* **87**, 1075–1084.

- Cocquerel, L., Wychowski, C., Minner, F., Penin, F. & Dubuisson, J. (2000).** Charged residues in the transmembrane domains of hepatitis C virus glycoproteins play a major role in the processing, subcellular localization, and assembly of these envelope proteins. *Journal of Virology* **74**, 3623–3633.
- Cocquerel, L., Meunier, J.-C. & de Beck, A. O. (2001).** Coexpression of hepatitis C virus envelope proteins E1 and E2 in cis improves the stability of membrane insertion of E2. *J Gen Virol.* **82**, 1629–1635.
- Colin, S., Guilmain, W., Creoff, E., Schneider, C., Steverlynck, C., Bongaerts, M., Legrand, E., Vannier, J. P., Muraine, M., & other authors. (2011).** A truncated form of CD9-partner 1 (CD9P-1), GS-168AT2, potently inhibits in vivo tumour-induced angiogenesis and tumour growth. *British Journal of Cancer* **105**, 1002–1011. Nature Publishing Group.
- Coller, K. E., Berger, K. L., Heaton, N. S., Cooper, J. D., Yoon, R. & Randall, G. (2009).** RNA interference and single particle tracking analysis of hepatitis C virus endocytosis. *PLoS Pathogens* **5**, e1000702.
- Conry-Cantilena, C., VanRaden, M., Gibble, J., Melpolder, J., Shakil, A. O., Viladomiu, L., Cheung, L., DiBisceglie, A., Hoofnagle, J. & Shih, J. W. (1996).** Routes of infection, viremia, and liver disease in blood donors found to have hepatitis C virus infection. *The New England Journal of Medicine* **334**, 1691–1696. Mass Medical Soc.
- Cooper, S., Erickson, A. L., Adams, E. J., Kansopon, J., Weiner, A. J., Chien, D. Y., Houghton, M., Parham, P. & Walker, C. M. (1999).** Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus. *Immunity* **10**, 439–449.
- Cormier, E. G., Tsamis, F., Kajumo, F., Durso, R. J., Gardner, J. P. & Dragic, T. (2004).** CD81 is an entry coreceptor for hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 7270–7274.
- Couzinet, S., Dubremetz, J. F., Buzoni-Gatel, D., Jeminet, G. & Prensier, G. (2000).** In vitro activity of the polyether ionophorous antibiotic monensin against the cyst form of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology.* **121**, 359–365.
- Craxì, A., Laffi, G. & Zignego, A. L. (2008).** Hepatitis C virus (HCV) infection: A systemic disease. *Molecular Aspects of Medicine* **29**, 85–95.
- Da Costa, D., Turek, M., Felmlee, D. J., Girardi, E., Pfeffer, S., Long, G., Bartenschlager, R., Zeisel, M. B. & Baumert, T. F. (2012).** Reconstitution of the Entire Hepatitis C Virus Life Cycle in Nonhepatic Cells. *Journal of Virology.* **86**, 11919–11925.
- Daecke, J., Fackler, O. T., Dittmar, M. T. & Kräusslich, H. G. (2005).** Involvement of Clathrin-Mediated Endocytosis in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Entry. *Journal of Virology* **79**, 1581–1594.
- Dalagiorgou, G., Vassilaki, N., Foka, P., Boumlic, A., Kakkanas, A., Kochlios, E., Khalili, S., Aslanoglou, E., Veletza, S., & other authors. (2011).** High levels of HCV core+1 antibodies in HCV patients with hepatocellular carcinoma. *Journal of General Virology* **92**, 1343–1351.
- Dao Thi, V. L., Granier, C., Zeisel, M. B., Guerin, M., Mancip, J., Granio, O., Penin, F., Lavillette, D., Bartenschlager, R., & other authors. (2012).** Characterization of Hepatitis C Virus Particle Subpopulations Reveals Multiple Usage of the Scavenger Receptor BI for Entry Steps. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 31242–31257.
- Davis, C., Harris, H. J., Hu, K., Drummer, H. E., McKeating, J. A., Mullins, J. G. L. & Balfe, P. (2012).** In silico directed mutagenesis identifies the CD81/claudin-1 hepatitis C virus receptor interface. *Cell Microbiol.* doi:10.1111/cmi.12008.

- Day, C. L., Lauer, G. M., Robbins, G. K., McGovern, B., Wurcel, A. G., Gandhi, R. T., Chung, R. T. & Walker, B. D. (2002).** Broad Specificity of Virus-Specific CD4+ T-Helper-Cell Responses in Resolved Hepatitis C Virus Infection. *Journal of Virology* **76**, 12584–12595.
- Delaguillaumie, A., Harriague, J., Kohanna, S., Bismuth, G., Rubinstein, E., Seigneuret, M. & Conjeaud, H. (2004).** Tetraspanin CD82 controls the association of cholesterol-dependent microdomains with the actin cytoskeleton in T lymphocytes: relevance to co-stimulation. *Journal of Cell Science* **117**, 5269–5282.
- Delandre, C., Penabaz, T. R., Passarelli, A. L., Chapes, S. K. & Clem, R. J. (2009).** Mutation of juxtamembrane cysteines in the tetraspanin CD81 affects palmitoylation and alters interaction with other proteins at the cell surface. *Experimental Cell Research* **315**, 1953–1963. Elsevier Inc.
- Deleersnyder, V., Pillez, A., Wychowski, C., Blight, K., Xu, J., Hahn, Y. S., Rice, C. M. & Dubuisson, J. (1997).** Formation of native hepatitis C virus glycoprotein complexes. *Journal of Virology* **71**, 697. American Society for Microbiology (ASM).
- Delgrange, D., Pillez, A., Castelain, S., Cocquerel, L., Rouille, Y., Dubuisson, J., Wakita, T., Duvet, S. & Wychowski, C. (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.
- Deneka, M., Pelchen-Matthews, A., Byland, R., Ruiz-Mateos, E. & Marsh, M. (2007).** In macrophages, HIV-1 assembles into an intracellular plasma membrane domain containing the tetraspanins CD81, CD9, and CD53. *The Journal of Cell Biology* **177**, 329–341.
- Dentzer, T. G., Lorenz, I. C., Evans, M. J. & Rice, C. M. (2009).** Determinants of the Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 2 Protease Domain Required for Production of Infectious Virus. *Journal of Virology* **83**, 12702–12713.
- Depla, M., Uzbekov, R., Hourieux, C., Blanchard, E., Gouge, A., Gillet, L. & Roingeard, P. (2010).** Ultrastructural and quantitative analysis of the lipid droplet clustering induced by hepatitis C virus core protein. *Cell Mol Life Sci* **67**, 3151–3161.
- Dewar, R. L., Vasudevachari, M. B., Natarajan, V. & Salzman, N. P. (1989).** Biosynthesis and processing of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins: effects of monensin on glycosylation and transport. *Journal of Virology* **63**, 2452. American Society for Microbiology (ASM).
- Dhillon, S., Witteveldt, J., Gatherer, D., Owsianka, A. M., Zeisel, M. B., Zahid, M. N., Rychlowska, M., Fong, S. K. H., Baumert, T. F., & other authors. (2010).** Mutations within a Conserved Region of the Hepatitis C Virus E2 Glycoprotein That Influence Virus-Receptor Interactions and Sensitivity to Neutralizing Antibodies. *Journal of Virology* **84**, 5494–5507.
- Didigu, C. A. & Doms, R. W. (2012).** Novel approaches to inhibit HIV entry. *Viruses* **4**, 309–324.
- Dore, G. J. (2012).** The changing therapeutic landscape for hepatitis C. *Medical Journal of Australia* **196**, 629–632.
- Dorner, M., Horwitz, J. A., Robbins, J. B., Barry, W. T., Feng, Q., Mu, K., Jones, C. T., Schoggins, J. W., Catanese, M. T., & other authors. (2011).** A genetically humanized mouse model for hepatitis C virus infection. *Nature* **474**, 208–211. Nature Publishing Group.
- Doughty, A. L., Spencer, J. D., Cossart, Y. E. & McCaughan, G. W. (1998).** Cholestatic hepatitis after liver transplantation is associated with persistently high serum hepatitis C virus RNA levels. *Liver Transplantation and Surgery*. **4**, 15-21.

- Dreux, M., Dao Thi, V. L., Fresquet, J., Guérin, M., Julia, Z., Verney, G., Durantel, D., Zoulim, F., Lavillette, D., & other authors. (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 (M. J. Evans, Ed.).
- Dreux, M., Pietschmann, T., Granier, C., Voisset, C., Ricard-Blum, S., Mangeot, P.-E., Keck, Z., Fong, S., Vu-Dac, N., & other authors. (2006).** High density lipoprotein inhibits hepatitis C virus-neutralizing antibodies by stimulating cell entry via activation of the scavenger receptor BI. *J Biol Chem* **281**, 18285–18295.
- Drummer, H. E., Boo, I., Maerz, A. L. & Pombourios, P. (2006).** A Conserved Gly436-Trp-Leu-Ala-Gly-Leu-Phe-Tyr Motif in Hepatitis C Virus Glycoprotein E2 Is a Determinant of CD81 Binding and Viral Entry. *Journal of Virology* **80**, 7844–7853.
- Drummer, H. E., Boo, I. & Pombourios, P. (2007).** Mutagenesis of a conserved fusion peptide-like motif and membrane-proximal heptad-repeat region of hepatitis C virus glycoprotein E1. *Journal of General Virology* **88**, 1144–1148.
- Drummer, H. E., Wilson, K. A. & Pombourios, P. (2002).** Identification of the hepatitis C virus E2 glycoprotein binding site on the large extracellular loop of CD81. *Journal of Virology*. **76**, 11143–11147.
- Drummer, H. E., Maerz, A. & Pombourios, P. (2003).** Cell surface expression of functional hepatitis C virus E1 and E2 glycoproteins. *FEBS LETTERS* **546**, 385–390.
- Drummer, H. E. & Pombourios, P. (2004).** Hepatitis C virus glycoprotein E2 contains a membrane-proximal heptad repeat sequence that is essential for E1E2 glycoprotein heterodimerization and viral entry. *J Biol Chem* **279**, 30066–30072.
- Drummer, H. E., Wilson, K. A. & Pombourios, P. (2005).** Determinants of CD81 dimerization and interaction with hepatitis C virus glycoprotein E2. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **328**, 251–257.
- Dubuisson, J., Hsu, H. H., Cheung, R. C., Greenberg, H. B., Russell, D. G. & Rice, C. M. (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., S, D., Meunier, J. C., Op de Beeck, A., Cacan, R., Wychowski, C. & Cocquerel, L. (2000).** Glycosylation of the Hepatitis C Virus Envelope Protein E1 Is Dependent on the Presence of a Downstream Sequence on the Viral Polyprotein. *J Biol Chem* **275**, 30605–30609.
- Dubuisson, J., Penin, F. & Moradpour, D. (2002).** Interaction of hepatitis C virus proteins with host cell membranes and lipids. *Trends in Cell Biology* **12**, 517–523.
- Egger, D., Wölk, B., Gosert, R., Bianchi, L., Blum, H. E., Moradpour, D. & Bienz, K. (2002).** Expression of Hepatitis C Virus Proteins Induces Distinct Membrane Alterations Including a Candidate Viral Replication Complex. *Journal of Virology* **76**, 5974–5984.
- Einav, S., Elazar, M., Danieli, T. & Glenn, J. S. (2004).** A Nucleotide Binding Motif in Hepatitis C Virus (HCV) NS4B Mediates HCV RNA Replication. *Journal of Virology* **78**, 11288–11295.
- Einav, S., Sklan, E. H., Moon, H. M., Gehrig, E., Liu, P., Hao, Y., Lowe, A. W. & Glenn, J. S. (2008).** The nucleotide binding motif of hepatitis C virus NS4B can mediate cellular transformation and tumor formation without Ha-ras co-transfection. *hepatology* **47**, 827–835.
- Elazar, M., Cheong, K. H., Liu, P., Greenberg, H. B., Rice, C. M. & Glenn, J. S. (2003).** Amphipathic Helix-Dependent Localization of NS5A Mediates Hepatitis C Virus RNA Replication. *Journal of Virology* **77**, 6055–6061.

- Elazar, M., Liu, P., Rice, C. M. & Glenn, J. S. (2004).** An N-Terminal Amphipathic Helix in Hepatitis C Virus (HCV) NS4B Mediates Membrane Association, Correct Localization of Replication Complex Proteins, and HCV RNA Replication. *Journal of Virology* **78**, 11393–11400. American Society for Microbiology (ASM).
- Escola, J. M., Kleijmeer, M. J., Stoorvogel, W., Griffith, J. M., Yoshie, O. & Geuze, H. J. (1998).** Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. *J Biol Chem* **273**, 20121–20127.
- Espenel, C., Margeat, E., Dosset, P., Arduise, C., Le Grimellec, C., Royer, C. A., Boucheix, C., Rubinstein, E. & Milhiet, P. E. (2008).** Single-molecule analysis of CD9 dynamics and partitioning reveals multiple modes of interaction in the tetraspanin web. *The Journal of Cell Biology* **182**, 765–776.
- Evans, M. J. (2004).** Phosphorylation of hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates its protein interactions and viral RNA replication. *PNAS* **101**, 13038–13043. National Academy of Sciences.
- Evans, M. J., Hahn, von, T., Tscherne, D. M., Syder, A. J., Panis, M., Wölk, B., Hatziioannou, T., McKeating, J. A., Bieniasz, P. D. & Rice, C. M. (2007).** Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* **446**, 801–805.
- Failla, C., Tomei, L. & De Francesco, R. (1994).** Both NS3 and NS4A are required for proteolytic processing of hepatitis C virus nonstructural proteins. *Journal of Virology* **68**, 3753–3760.
- Falkowska, E., Kajumo, F., Garcia, E., Reinus, J. & Dragic, T. (2007).** Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein E2 Glycans Modulate Entry, CD81 Binding, and Neutralization. *Journal of Virology* **81**, 8072–8079. American Society for Microbiology (ASM).
- Farci, P., Alter, H. J., Govindarajan, S., Wong, D. C., Engle, R., Lesniewski, R. R., Mushahwar, I. K., Desai, S. M., Miller, R. H. & Ogata, N. (1992).** Lack of protective immunity against reinfection with hepatitis C virus. *Science* **258**, 135–140.
- Farci, P., Alter, H. J., SUSHI, S. A., Govindarajan, S., Cheung, L. C., JC, M., Sacher, R. A., Shih, J. W. & Purcell, R. H. (1996a).** Hepatitis C Virus–Associated Fulminant Hepatic Failure. *The New England Journal of Medicine*. **9**, 631-634.
- Farci, P., Alter, H. J., Wong, D. C., Miller, R. H., Govindarajan, S., Engle, R., Shapiro, M. & Purcell, R. H. (1994).** Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees after antibody-mediated in vitro neutralization. *Proc Nat Acad Sct USA*. **91**, 7792-7796.
- Farci, P., Shimoda, A., Coiana, A., Diaz, G., Peddis, G., Melpolder, J. C., Strazzer, A., Chien, D. Y., Munoz, S. J., & other authors. (2000).** The Outcome of Acute Hepatitis C Predicted by the Evolution of the Viral Quasispecies. *Science* **288**, 339–344.
- Farci, P., SUSHI, S. A., Wong, D., Cabezon, T., De Gioannis, D., Strazzer, A., Shimizu, Y., Shapiro, M., Alter, H. J. & Purcell, R. H. (1996b).** Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees by hyperimmune serum against the hypervariable region 1 of the envelope 2 protein. *Proc Nat Acad Sct USA*. **93**, 15394–15399.
- Farquhar, M. J., Hu, K., Harris, H. J., Davis, C., Brimacombe, C. L., Fletcher, S. J., Baumert, T. F., Rappoport, J. Z., Balfe, P. & McKeating, J. A. (2012).** Hepatitis C Virus Induces CD81 and Claudin-1 Endocytosis. *Journal of Virology* **86**, 4305–4316.
- Feinstone, S. M., Kapikian, A. Z., Purcell, R. H., Alter, H. J. & Holland, P. V. (1975).** Transfusion-Associated Hepatitis Not Due to Viral Hepatitis Type A or B. *The New England Journal of Medicine* **292**, 767–770.

- Feld, J. J. & Hoofnagle, J. H. (2005).** Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. *hepatology* **436**, 967–972.
- Fiorucci, M., Boulant, S., Fournillier, A., Abraham, J. D., Lavergne, J.-P., Paranhos-Baccala, G., Inchauspé, G. & Bain, C. (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.
- Fletcher, N. F. & McKeating, J. A. (2012).** Hepatitis C virus and the brain. *Nature Cell Biology* **19**, 301–306.
- Flint, M., Hahn, von, T., Zhang, J., Farquhar, M., Jones, C. T., Balfe, P., Rice, C. M. & McKeating, J. A. (2006).** Diverse CD81 Proteins Support Hepatitis C Virus Infection. *Journal of Virology* **80**, 11331–11342.
- Flint, M., Maidens, C., Loomis-Price, L. D., Shotton, C., Dubuisson, J., Monk, P., Higginbottom, A., Levy, S. & McKeating, J. A. (1999).** Characterization of Hepatitis C Virus E2 Glycoprotein Interaction with a Putative Cellular Receptor, CD81. *Journal of Virology* **73**, 6235. American Society for Microbiology (ASM).
- Fofana, I., Krieger, S. E., Grunert, F., Glaubens, S., Xiao, F., Kremer, S. F., Soulier, E., Royer, C., Thumann, C., & other authors. (2010).** Monoclonal Anti-Claudin 1 Antibodies Prevent Hepatitis C Virus Infection of Primary Human Hepatocytes. *YGASt* **139**, 953–964.e4. Elsevier Inc.
- Forns, X., Allander, T., Rohwer-Nutter, P. & Bukh, J. (2000).** Characterization of Modified Hepatitis C Virus E2 Proteins Expressed on the Cell Surface. *Virology* **274**, 75–85.
- Fournier, C., Sureau, C., Coste, J., Ducos, J., Pageaux, G., Larrey, D., Domergue, J. & Maurel, P. (1998).** In vitro infection of adult normal human hepatocytes in primary culture by hepatitis C virus. *Journal of General Virology*. **79**, 2367–2374.
- Fournier, M., Peyrou, M., Bourgoin, L., Maeder, C., Tchou, I. & Foti, M. (2010).** CD4 dimerization requires two cysteines in the cytoplasmic domain of the molecule and occurs in microdomains distinct from lipid rafts. *Mol Immunol* **47**, 2594–2603.
- Fraile-Ramos, A., Pelchen-Matthews, A., Risco, C., Rejas, M. T., Emery, V. C., Hassan-Walker, A. F., Esteban, M. & Marsh, M. (2007).** The ESCRT machinery is not required for human cytomegalovirus envelopment. *Cell Microbiol* **9**, 2955–2967.
- Frank, C., Mohamed, M. K., Strickland, G. T., Lavanchy, D., Arthur, R. R., Magder, L. S., Khoby, El, T., Abdel-Wahab, Y., Aly Ohn, E. S., & other authors. (2000).** The role of parenteral antischistosomal therapy in the spread of hepatitis C virus in Egypt. *Lancet* **355**, 887–891.
- Friebe, P., Boudet, J., Simorre, J. P. & Bartenschlager, R. (2005).** Kissing-loop interaction in the 3' end of the hepatitis C virus genome essential for RNA replication. *Journal of Virology* **79**, 380–392. Am Soc Microbiol.
- Friebe, P., Lohmann, V., Krieger, N. & Bartenschlager, R. (2001).** Sequences in the 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication. *Journal of Virology* **75**, 12047–12057.
- Fritz, R., Stiasny, K. & Heinz, F. X. (2008).** Identification of specific histidines as pH sensors in flavivirus membrane fusion. *The Journal of Cell Biology* **183**, 353–361.
- Fritzsching, B., Schwer, B., Kartenbeck, J., Pedal, A., Horejsi, V. & Ott, M. (2002).** Release and intercellular transfer of cell surface CD81 via microparticles. *J Immunol* **169**, 5531–5537.
- Gale, M. & Foy, E. M. (2005).** Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus. *hepatology* **436**, 939–945. Nature Publishing Group.

- Galmozzi, E. E., Aghemo, A. A. & Colombo, M. M. (2012).** Eukaryotic initiation factor 5B: A new player for the anti-hepatitis C virus effect of ribavirin? *Med Hypotheses* **79**, 471–473.
- Galossi, A., Guarisco, R., Bellis, L. & Puoti, C. (2007).** Extrahepatic manifestations of chronic HCV infection. *J Gastrointest Liver Dis* **16**, 65–73.
- Gambin, Y., Lopez-Esparza, R., Reffay, M., Sierecki, E., Gov, N. S., Genest, M., Hodges, R. S. & Urbach, W. (2006).** Lateral mobility of proteins in liquid membranes revisited. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 2098–2102.
- Garcia, E., Nikolic, D. S. & Piguet, V. (2008).** HIV-1 Replication in Dendritic Cells Occurs Through a Tetraspanin-Containing Compartment Enriched in AP-3. *Traffic* **9**, 200–214.
- Garcia-España, A., Chung, P.-J., Sarkar, I. N., Stiner, E., Sun, T.-T. & DeSalle, R. (2008).** Appearance of new tetraspanin genes during vertebrate evolution. *Genomics* **91**, 326–334.
- Gardner, J. P., Durso, R. J., Arrigale, R. R., Donovan, G. P., Maddon, P. J., Dragic, T. & Olson, W. C. (2003).** L-SIGN (CD 209L) is a liver-specific capture receptor for hepatitis C virus. *PNAS* **100**, 4498. National Academy of Sciences.
- Garrone, P., Fluckiger, A. C., Mangeot, P. E., Gauthier, E., Dupeyrot-Lacas, P., Mancip, J., Cangialosi, A., Chene, Du, I., LeGrand, R., & other authors. (2011).** A Prime-Boost Strategy Using Virus-Like Particles Pseudotyped for HCV Proteins Triggers Broadly Neutralizing Antibodies in Macaques. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **3**, 94ra71–94ra71.
- Gastaminza, P., Cheng, G., Wieland, S., Zhong, J., Liao, W. & Chisari, F. V. (2008).** Cellular Determinants of Hepatitis C Virus Assembly, Maturation, Degradation, and Secretion. *Journal of Virology* **82**, 2120–2129.
- Gastaminza, P., Dryden, K. A., Boyd, B., Wood, M. R., Law, M., Yeager, M. & Chisari, F. V. (2010).** Ultrastructural and Biophysical Characterization of Hepatitis C Virus Particles Produced in Cell Culture. *Journal of Virology* **84**, 10999–11009. American Society for Microbiology (ASM).
- Gastaminza, P., Kapadia, S. B. & Chisari, F. V. (2006).** Differential Biophysical Properties of Infectious Intracellular and Secreted Hepatitis C Virus Particles. *Journal of Virology* **80**, 11074–11081.
- Gerlach, J. T., Diepolder, H. M., Jung, M. C., Gruener, N. H., Schraut, W. W., Zachoval, R., Hoffmann, R., Schirren, C. A., Santantonio, T. & Pape, G. R. (1999).** Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus-specific CD4<sup>+</sup> T-cell response in acute hepatitis C. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **117**, 933–941.
- Germi, R. L., Crance, J.-M., Garin, D., Guimet, J., Lortat-Jacob, H., Ruigrok, R. W. H., Zarski, J.-P. & Drouet, E. (2002a).** Cellular glycosaminoglycans and low density lipoprotein receptor are involved in hepatitis C virus adsorption. *Journal of Medical Virology* **68**, 206–215.
- Germi, R., Crance, J.-M., Garin, D., Guimet, J., Lortat-Jacob, H., Ruigrok, R. W. H., Zarski, J.-P. & Drouet, E. (2002b).** Heparan Sulfate-Mediated Binding of Infectious Dengue Virus Type 2 and Yellow Fever Virus. *Virology* **292**, 162–168.
- Ghosh-Choudhury, N., Graham, A. & Ghosh, H. P. (1987).** Herpes simplex virus type 2 glycoprotein biogenesis: effect of monensin on glycoprotein maturation, intracellular transport and virus infectivity. *J Gen Virol* **68**, 1939–1949.

- Gibot, S., Jeminet, G., Juillard, J., Gumila, C., Ancelin, M.-L., Vial, H. & Delort, A.-M. (1999).** Cationomycin and Monensin Partition between Serum Proteins and Erythrocyte Membrane: Consequences for Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> Transport and Antimalarial Activities. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **363**, 361–372.
- Gil-Falgon, S., Davy, J. & Féger, J. (1992).** Effect of monensin and diabetes on asialoglycoprotein degradation in rat hepatocytes. *Experientia*. **48**, 745-748.
- Glazar, A. I. & Evans, J. P. (2009).** IgSF8 (EWI-2) and CD9 in fertilization: Evidence of distinct functions for CD9 and a CD9-associated protein in mammalian sperm-egg interaction. *Reproduction, Fertility and Development* **21**, 293. NIH Public Access.
- Goenaga, A.-L., Zhou, Y., Legay, C., Bougherara, H., Huang, L., Liu, B., Drummond, D. C., Kirpotin, D. B., Auclair, C., & other authors. (2007).** Identification and characterization of tumor antigens by using antibody phage display and intrabody strategies. *Mol Immunol* **44**, 3777–3788.
- Goffard, A., Callens, N., Bartosch, B., Wychowski, C., Cosset, F. L., Montpellier, C. & Dubuisson, J. (2005).** Role of N-Linked Glycans in the Functions of Hepatitis C Virus Envelope Glycoproteins. *Journal of Virology* **79**, 8400–8409. American Society for Microbiology (ASM).
- Gong, Q., Cheng, M., Chen, H., Liu, X., Si, Y., Yang, Y., Yuan, Y., Jin, C., Yang, W., & other authors. (2011).** Phospholipid scramblase 1 mediates hepatitis C virus entry into host cells. *FEBS LETTERS* **585**, 2647–2652. Federation of European Biochemical Societies.
- Gonzalez-Mariscal, L., Garay, E. & Lechuga, S. (2009).** Virus interaction with the apical junctional complex. *Frontiers in Bioscience*. **14**, 731-768.
- Gordón-Alonso, M. M., Yañez-Mó, M. M., Barreiro, O. O., Alvarez, S. S., Muñoz-Fernández, M. A. M., Valenzuela-Fernández, A. A. & Sánchez-Madrid, F. F. (2006).** Tetraspanins CD9 and CD81 modulate HIV-1-induced membrane fusion. *J Immunol* **177**, 5129–5137.
- Gordón-Alonso, M., Sala-Valdés, M., Rocha-Perugini, V., Pérez-Hernández, D., López-Martín, S., Ursa, A., Álvarez, S., Kolesnikova, T. V., Vázquez, J., & other authors. (2012).** EWI-2 Association with -Actinin Regulates T Cell Immune Synapses and HIV Viral Infection. *The Journal of Immunology* **189**, 689–700.
- Gosert, R., Egger, D., Lohmann, V., Bartenschlager, R., Blum, H. E., Bienz, K. & Moradpour, D. (2003).** Identification of the Hepatitis C Virus RNA Replication Complex in Huh-7 Cells Harboring Subgenomic Replicons. *Journal of Virology* **77**, 5487–5492. American Society for Microbiology (ASM).
- Gottwein, J. M., Scheel, T. K. H., Jensen, T. B., Lademann, J. B., Prentoe, J. C., Knudsen, M. L., Hoegh, A. M. & Bukh, J. (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.
- Goeslain, L., Alsaleh, K., Horellou, P., Roingeard, P., Descamps, V., Duvet, S., Ciczora, Y., Wychowski, C., Dubuisson, J. & Rouille, Y. (2010).** Identification of GBF1 as a Cellular Factor Required for Hepatitis C Virus RNA Replication. *Journal of Virology* **84**, 773–787.
- Gouttenoire, J., Castet, V., Montserret, R., Arora, N., Raussens, V., Ruyschaert, J. M., Diesis, E., Blum, H. E., Penin, F. & Moradpour, D. (2009a).** Identification of a Novel Determinant for Membrane Association in Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 4B. *Journal of Virology* **83**, 6257–6268. American Society for Microbiology (ASM).

- Gouttenoire, J., Montserret, R., Kennel, A., Penin, F. & Moradpour, D. (2009b).** An Amphipathic  $\alpha$ -Helix at the C Terminus of Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 4B Mediates Membrane Association. *Journal of Virology* **83**, 11378–11384. American Society for Microbiology (ASM).
- Gouttenoire, J., Roingeard, P., Penin, F. & Moradpour, D. (2010).** Amphipathic  $\alpha$ -Helix AH2 Is a Major Determinant for the Oligomerization of Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 4B. *Journal of Virology* **84**, 12529–12537.
- Grahovac, B., Bingulac-Popović, J., Vucelić, B., Hrštić, I., Ostojić, R., Dražić, V., Bališa, M. & Grgičević, D. (2000).** Hypervariable Region 1 of Hepatitis C Virus Genome and Response to Interferon Therapy. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* **38**, 905–910.
- Grakoui, A., Wychowski, C., Lin, C., Feinstone, S. M. & Rice, C. M. (1993).** Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products. *Journal of Virology* **67**, 1385–1395.
- Grakoui, A., Shoukry, N. H., Woollard, D. J., Han, J.-H., Hanson, H. L., Ghayeb, J., Murthy, K. K., Rice, C. M. & Walker, C. M. (2003).** HCV persistence and immune evasion in the absence of memory T cell help. *Science* **302**, 659–662.
- Grebely, J., Matthews, G. V. & Dore, G. J. (2011).** Treatment of acute HCV infection. *hepatology* **8**, 265–274. Nature Publishing Group.
- Griffin, S. D. C., Harvey, R., Clarke, D. S., Barclay, W. S., Harris, M. & Rowlands, D. J. (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. *J Gen Virol* **85**, 451–461.
- Griffin, S., Clarke, D., McCormick, C., Rowlands, D. & Harris, M. (2005).** Signal peptide cleavage and internal targeting signals direct the hepatitis C virus p7 protein to distinct intracellular membranes. *Journal of Virology* **79**, 15525–15536.
- Grinde, B. (1983).** Effect of carboxylic ionophores on lysosomal protein degradation in rat hepatocytes. *Experimental Cell Research* **149**, 27–35.
- Grove, J., Huby, T., Stamatakis, Z., Vanwolleghem, T., Meuleman, P., Farquhar, M., Schwarz, A., Moreau, M., Owen, J. S., & other authors. (2007).** Scavenger Receptor BI and BII Expression Levels Modulate Hepatitis C Virus Infectivity. *Journal of Virology* **81**, 3162–3169.
- Grove, J., Nielsen, S., Zhong, J., Bassendine, M. F., Drummer, H. E., Balfe, P. & McKeating, J. A. (2008).** Identification of a Residue in Hepatitis C Virus E2 Glycoprotein That Determines Scavenger Receptor BI and CD81 Receptor Dependency and Sensitivity to Neutralizing Antibodies. *Journal of Virology* **82**, 12020–12029.
- Grüner, N. H., Gerlach, T. J., Jung, M. C., Diepolder, H. M., Schirren, C. A., Schraut, W. W., Hoffmann, R., Zachoval, R., Santantonio, T., & other authors. (2000).** Association of Hepatitis C Virus—Specific CD8<sup>+</sup> T Cells with Viral Clearance in Acute Hepatitis C. *The Journal of Infectious Diseases*. **181**, 1528–1536.
- Gu, M. & Rice, C. M. (2010).** Three conformational snapshots of the hepatitis C virus NS3 helicase reveal a ratchet translocation mechanism. *PNAS*. **107** (2), 521–528.
- Guilmain, W., Colin, S., Legrand, E., Vannier, J. P., Steverlynck, C., Bongaerts, M., Vasse, M. & Al-Mahmood, S. (2011).** CD9P-1 expression correlates with the metastatic status of lung cancer, and a truncated form of CD9P-1, GS-168AT2, inhibits in vivo tumour growth. *British Journal of Cancer* **104**, 496–504.

- Gumila, C., Ancelin, M. L., Delort, A. M., Jeminet, G. & Vial, H. J. (1997).** Characterization of the potent in vitro and in vivo antimalarial activities of ionophore compounds. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **41**, 523–529.
- Gumila, C., Ancelin, M. L., Jeminet, G., Delort, A. M., Miquel, G. & Vial, H. J. (1996).** Differential in vitro activities of ionophore compounds against *Plasmodium falciparum* and mammalian cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **40**, 602–608.
- Habersetzer, F., Honnet, G., Bain, C., Maynard-Muet, M., Leroy, V., Zarski, J. P., Feray, C., Baumert, T. F., Bronowiki, J. P., Doffoël, M., Trépo, C., Aghaton, D., Toh, M. L., Baudin, M., Bonnefoy, J. Y., Limacher, J. M. & Inchauspé, G. (2011).** A poxvirus vaccine is safe, induces T-cell responses, and decreases viral load in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology*. **141** (3), 890-899.e4.
- Hahn, von, T., Lindenbach, B. D., Boullier, A., Quehenberger, O., Paulson, M., Rice, C. M. & McKeating, J. A. (2006).** Oxidized low-density lipoprotein inhibits hepatitis C virus cell entry in human hepatoma cells. *hepatology* **43**, 932–942.
- Hahn, von, T., Yoon, J. C., Alter, H., Rice, C. M., Rehmann, B., Balfe, P. & McKeating, J. A. (2007).** Hepatitis C Virus Continuously Escapes From Neutralizing Antibody and T-Cell Responses During Chronic Infection In Vivo. *YGA* **132**, 667–678.
- Haid, S., Pietschmann, T. & Pécheur, E. I. (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.
- Haining, E. J., Yang, J., Bailey, R. L., Khan, K., Collier, R., Tsai, S., Watson, S. P., Frampton, J., Garcia, P. & Tomlinson, M. G. (2012).** The TspanC8 subgroup of tetraspanins interact with A disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10) and regulate its maturation and cell surface expression. *J Biol Chem*.
- Halliday, J., Klenerman, P. & Barnes, E. (2011).** Vaccination for hepatitis C virus: closing in on an evasive target. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **10**, 659–672.
- Han, Q., Xu, C., Wu, C., Zhu, W., Yang, R. & Chen, X. (2009).** Compensatory mutations in NS3 and NS5A proteins enhance the virus production capability of hepatitis C reporter virus. *Virus Research* **145**, 63–73.
- Haney, M. E. & Hoehn, M. M. (1967).** Monensin, a new biologically active compound. I. Discovery and isolation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **7**, 349-352.
- Hanouille, X., Badillo, A., Wieruszkeski, J. M., Verdegem, D., Landrieu, I., Bartenschlager, R., Penin, F. & Lippens, G. (2009).** Hepatitis C virus NS5A protein is substrate for the peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase activity of cyclophilins A and B. *J Biol Chem*. **284** (20), 13589-13601.
- Harford, J., Wolkoff, A. W., Ashwell, G. & Klausner, R. D. (1983).** Monensin inhibits intracellular dissociation of asialoglycoproteins from their receptor. *The Journal of Cell Biology* **96**, 1824. The Rockefeller University Press.
- Harris, H. J., Clerte, C., Farquhar, M. J., Goodall, M., Hu, K., Rassam, P., Dosset, P., Wilson, G. K., Balfe, P., & other authors. (2012).** Hepatoma polarization limits CD81 and hepatitis C virus dynamics. *Cell Microbiol*. doi: 10.1111/cmi.12047.
- Harris, H. J., Davis, C., Mullins, J. G. L., Hu, K., Goodall, M., Farquhar, M. J., Mee, C. J., McCaffrey, K., Young, S., & other authors. (2010).** Claudin Association with CD81 Defines Hepatitis C Virus Entry. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 21092–21102.
- Harris, H. J., Farquhar, M. J., Mee, C. J., Davis, C., Reynolds, G. M., Jennings, A., Hu, K., Yuan, F., Deng, H., & other authors. (2008).** CD81 and Claudin 1 Coreceptor Association: Role in Hepatitis C Virus Entry. *Journal of Virology* **82**, 5007–5020.

- Hasuwa, H., Shishido, Y., Yamazaki, A., Kobayashi, T., Yu, X. & Mekada, E. (2001).** CD9 Amino Acids Critical for Upregulation of Diphtheria Toxin Binding. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **289**, 782–790.
- He, Z.-Y., Gupta, S., Myles, D. & Primakoff, P. (2009).** Loss of surface EW1-2 on CD9 null oocytes. *Mol Reprod Dev* **76**, 629–636.
- Heikens, M. J., Cao, T. M., Morita, C., DeHart, S. L. & Tsai, S. (2007).** Penumbra encodes a novel tetraspanin that is highly expressed in erythroid progenitors and promotes effective erythropoiesis. *Blood* **109**, 3244–3252.
- Helle, F., Goffard, A., Morel, V., Duvet, S., McKeating, J., Keck, Z. Y., Foug, S., Penin, F., Dubuisson, J. & Voisset, C. (2007).** The Neutralizing Activity of Anti-Hepatitis C Virus Antibodies Is Modulated by Specific Glycans on the E2 Envelope Protein. *Journal of Virology* **81**, 8101–8111. American Society for Microbiology (ASM).
- Helle, F., Vieyres, G., Elkrief, L., Popescu, C. I., Wychowski, C., Descamps, V., Castelain, S., Roingeard, P., Duvet, S. & Dubuisson, J. (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.
- Helle, F., Wychowski, C., Vu-Dac, N., Gustafson, K. R., Voisset, C. & Dubuisson, J. (2006).** Cyanovirin-N inhibits hepatitis C virus entry by binding to envelope protein glycans. *J Biol Chem* **281**, 25177–25183.
- Hemler, M. E. (2005).** Tetraspanin functions and associated microdomains. *Nature Publishing Group* **6**, 801–811.
- Heydtmann, M., Shields, P., McCaughan, G. & Adams, D. (2001).** Cytokines and chemokines in the immune response to hepatitis C infection. *Current opinion in infectious diseases* **14**, 279.
- Higginbottom, A., Quinn, E. R., Kuo, C. C., Flint, M., Wilson, L. H., Bianchi, E., Nicosia, A., Monk, P. N., McKeating, J. A., & other authors. (2000).** Identification of Amino Acid Residues in CD81 Critical for Interaction with Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein E2. *Journal of Virology* **74**, 3642. American Society for Microbiology (ASM).
- Hijikata, M., Shimizu, Y. K., Kato, H., Iwamoto, A., Shih, J. W., Alter, H. J., Purcell, R. H. & Yoshikura, H. (1993).** Equilibrium centrifugation studies of hepatitis C virus: evidence for circulating immune complexes. *Journal of Virology*. **67**, 1953-1958.
- Hikosaka, K., Noritake, H., Kimura, W., Sultana, N., Sharkar, M. T. K., Tagawa, Y.-I., Uezato, T., Kobayashi, Y., Wakita, T. & Miura, N. (2011).** Expression of human factors CD81, claudin-1, scavenger receptor, and occludin in mouse hepatocytes does not confer susceptibility to HCV entry. *Biomedical Research* **32**, 143–150.
- Ho, S. H., Martin, F., Higginbottom, A., Partridge, L. J., Parthasarathy, V., Moseley, G. W., Lopez, P., Cheng-Mayer, C. & Monk, P. N. (2006).** Recombinant Extracellular Domains of Tetraspanin Proteins Are Potent Inhibitors of the Infection of Macrophages by Human Immunodeficiency Virus Type 1. *Journal of Virology* **80**, 6487–6496.
- Hoffman, B. & Liu, Q. (2011).** Hepatitis C viral protein translation: mechanisms and implications in developing antivirals. *Liver Int* **31**, 1449–1467.
- Hoffmann, R. M., Dielpoder, H. M., Zachoval, R., Zwiebel, F. M., Jung, M. C., Scholz, S., Nitschko, H., Riethmüller, G. & Pape, G. R. (1995).** Mapping of immunodominant CD4+ T lymphocyte epitopes of hepatitis C virus antigens and their relevance during the course of chronic infection. *hepatology*. **21**, 632-8.
- Hollinger, F. B., Gitnick, G. L., Aach, R. D., Szminess, W., Mosley, J. W., Stevens, C. E., Peters, R. L., Weiner, J. M., Werch, J. B. & Lander, J. J. (1978).** Non-A, non-B

- hepatitis transmission in chimpanzees : a project of the transfusion-transmitted viruses study group. *Intervirology*. **10**, 60-68.
- Hoofnagle, J. H., Mullen, K. D., Jones, D. B., Rustgi, V., Di Bisceglie, A., Peters, M., Waggoner, J. G., Park, Y. & Jones, E. A. (1986).** Treatment of chronic non-A,non-B hepatitis with recombinant human alpha interferon. A preliminary report. *The New England Journal of Medicine*. **315**, 1575-8.
- Hoofnagle, J. H. (2002).** Course and outcome of hepatitis C. *hepatology* **36**, s21-s29.
- Hotta, H., Ross, A. H., Huebner, K., Isobe, M., Wendeborn, S., Chao, M. V., Ricciardi, R. P., Tsujimoto, Y., Croce, C. M. & Koprowski, H. (1988).** Molecular Cloning and Characterization of an Antigen Associated with Early Stages of Melanoma Tumor Progression. *Cancer Res*. **48**, 2955-62.
- Hsu, M., Zhang, J., Flint, M., Logvinoff, C., Cheng-Mayer, C., Rice, C. M. & McKeating, J. A. (2003).** Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 7271-7276.
- Huang, H., Sun, F., Owen, D. M., Li, W., Chen, Y., Gale, M. & Ye, J. (2007).** Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins. *PNAS* **104**, 5848-5853. National Academy of Sciences.
- Huang, L., Hwang, J., Sharma, S. D., Hargittai, M. R., Chen, Y., Arnold, J. J., Raney, K. D. & Cameron, C. E. (2005a).** Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5A (NS5A) Is an RNA-binding Protein. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 36417-36428.
- Huang, S., Tian, H., Chen, Z., Yu, T. & Xu, A. (2010).** The evolution of vertebrate tetraspanins: gene loss, retention, and massive positive selection after whole genome duplications. *BMC Evolutionary Biology* **10**, 306. BioMed Central.
- Huang, S., Yuan, S., Dong, M., Su, J., Yu, C., Shen, Y., Xie, X., Yu, Y., Yu, X., & other authors. (2005b).** The phylogenetic analysis of tetraspanins projects the evolution of cell-cell interactions from unicellular to multicellular organisms. *Genomics* **86**, 674-684.
- Iacob, R. E., Keck, Z., Olson, O., Fong, S. K. H. & Tomer, K. B. (2008).** Structural elucidation of critical residues involved in binding of human monoclonal antibodies to hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein. *Biochim Biophys Acta* **1784**, 530-542.
- Iglesias-Bartolome, R., Crespo, P. M., Gomez, G. A. & Daniotti, J. L. (2006).** The antibody to GD3 ganglioside, R24, is rapidly endocytosed and recycled to the plasma membrane via the endocytic recycling compartment. Inhibitory effect of brefeldin A and monensin. *The FEBS Journal* **273**, 1744-1758.
- Imai, T. T. & Yoshie, O. O. (1993).** C33 antigen and M38 antigen recognized by monoclonal antibodies inhibitory to syncytium formation by human T cell leukemia virus type 1 are both members of the transmembrane 4 superfamily and associate with each other and with CD4 or CD8 in T cells. *J Immunol* **151**, 6470-6481.
- Indolfi, G. & Resti, M. (2009).** Perinatal transmission of hepatitis C virus infection. *Journal of Medical Virology* **81**, 836-843.
- Ip, P. P., Nijman, H. W., Wilschut, J. & Daemen, T. (2012).** Therapeutic vaccination against chronic hepatitis C virus infection. *Antiviral Research* **96**, 36-50.
- Ito, C., Yamatoya, K., Yoshida, K., Maekawa, M., Miyado, K. & Toshimori, K. (2010).** Tetraspanin family protein CD9 in the mouse sperm: unique localization, appearance, behavior and fate during fertilization. *Cell and Tissue Research* **340**, 583-594. Springer-Verlag.
- Ito, M., Kusunoki, H. & Mizuochi, T. (2011).** Peripheral B Cells as Reservoirs for Persistent HCV Infection. *Frontiers in Microbiology* **2**. Frontiers Media SA.

- Ito, T., Mukaigawa, J., Zuo, J., Hirabayashi, Y., Mitamura, K. & Yasui, K. (1996).** Cultivation of hepatitis C virus in primary hepatocyte culture from patients with chronic hepatitis C results in release of high titre infectious virus. *J Gen Virol* **77**, 1043–1054.
- Jackel-Cram, C., Babiuk, L. A. & Liu, Q. (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. *Trends in Cell Biology* **46**, 999–1008.
- Jiang, J. & Luo, G. (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., Cun, W., Wu, X., Shi, Q., Tang, H. & Luo, G. (2012).** Hepatitis C virus attachment mediated by apolipoprotein E binding to cell surface heparan sulfate. *Journal of Virology* **86**, 7256–7267.
- Jirasko, V., Montserret, R., Appel, N., Janvier, A., Eustachi, L., Brohm, C., Steinmann, E., Pietschmann, T., Penin, F. & Bartenschlager, R. (2008).** Structural and functional characterization of nonstructural protein 2 for its role in hepatitis C virus assembly. *J Biol Chem.* **283**, 28546–62.
- Jirasko, V., Montserret, R., Lee, J. Y., Gouttenoire, J., Moradpour, D., Penin, F. & Bartenschlager, R. (2010).** Structural and functional studies of nonstructural protein 2 of the hepatitis C virus reveal its key role as organizer of virion assembly. *PLoS Pathogens* **6**, e1001233.
- Johnson, D. C. & Hubert, M. T. (2002).** Direct Egress of Animal Viruses Promotes Cell-to-Cell Spread. *Journal of Experimental Medicine* **199**, 283–293. The Rockefeller University Press.
- Johnson, D. C. & Spear, P. G. (1982).** Monensin inhibits the processing of herpes simplex virus glycoproteins, their transport to the cell surface, and the egress of virions from infected cells. *Journal of Virology* **43**, 1102–1112.
- Jolly, C. & Sattentau, Q. J. (2007).** Human Immunodeficiency Virus Type 1 Assembly, Budding, and Cell-Cell Spread in T Cells Take Place in Tetraspanin-Enriched Plasma Membrane Domains. *Journal of Virology* **81**, 7873–7884.
- Jones, C. T., Catanese, M. T., Law, L. M. J., Khetani, S. R., Syder, A. J., Ploss, A., Oh, T. S., Schoggins, J. W., MacDonald, M. R., & other authors. (2010).** Real-time imaging of hepatitis C virus infection using a fluorescent cell-based reporter system. *Nature Biotechnology* **28**, 167–171. Nature Publishing Group.
- Jones, C. T., Murray, C. L., Eastman, D. K., Tassello, J. & Rice, C. M. (2007).** Hepatitis C virus p7 and NS2 proteins are essential for production of infectious virus. *Journal of Virology* **81**, 8374–8383.
- Jones, D. M., Patel, A. H., Targett-Adams, P. & McLauchlan, J. (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.
- Kaito, M., Watanabe, S., Tsukiyama-Kohara, K., Yamaguchi, K., Kobayashi, Y., Konishi, M., Yokoi, M., Ishida, S., Suzuki, S. & Kohara, M. (1994).** Hepatitis C virus particle detected by immunoelectron microscopic study. *Journal of General Virology.* **75**, 1755–1760.
- Kaji, K., Oda, S., Shikano, T., Ohnuki, T., Uematsu, Y., Sakagami, J., Tada, N., Miyazaki, S. & Kudo, A. (2000).** The gamete fusion process is defective in eggs of Cd9-deficient mice. *Nature Genetics* **24**, 279–282.
- Kalinina, O., Norder, H., Mukomolov, S. & Magnusius, L. O. (2002).** A Natural Intergenotypic Recombinant of Hepatitis C Virus Identified in St. Petersburg. *Journal of Virology* **76**, 4034–4043. American Society for Microbiology (ASM).

- Kamal, S. M., Fouly, A. E., Kamel, R. R., Hockenjos, B., Tawil, Al, A., Khalifa, K. E., He, Q., Koziel, M. J., Naggar, El, K. M., & other authors. (2006).** Peginterferon Alfa-2b Therapy in Acute Hepatitis C: Impact of Onset of Therapy on Sustained Virologic Response. *hepatology* **130**, 632–638.
- Kanda, T., Steele, R., Ray, R. & Ray, R. B. (2007).** Small interfering RNA targeted to hepatitis C virus 5' nontranslated region exerts potent antiviral effect. *Journal of Virology* **81**, 669–676. Am Soc Microbiol.
- Kang, J.-I., Kim, J. P., Wakita, T. & Ahn, B.-Y. (2009).** Cell culture-adaptive mutations in the NS5B gene of hepatitis C virus with delayed replication and reduced cytotoxicity. *Virus Research* **144**, 107–116.
- Kapadia, S. B., Barth, H., Baumert, T., McKeating, J. A. & Chisari, F. V. (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. American Society for Microbiology (ASM).
- Karamatic Crew, V., Burton, N., Kagan, A., Green, C. A., Levene, C., Flinter, F., Brady, R. L., Daniels, G. & Anstee, D. J. (2004).** CD151, the first member of the tetraspanin (TM4) superfamily detected on erythrocytes, is essential for the correct assembly of human basement membranes in kidney and skin. *Blood*. **104**, 2217-2223.
- kato, T., Matsumura, T., Heller, T., Saito, S., Sapp, R. K., Murthy, K., Wakita, T. & Liang, T. J. (2007).** Production of Infectious Hepatitis C Virus of Various Genotypes in Cell Cultures. *Journal of Virology* **81**, 4405–4411. American Society for Microbiology (ASM).
- Kato, T. T., Date, T. T., Miyamoto, M. M., Furusaka, A. A., Tokushige, K. K., Mizokami, M. M. & Wakita, T. T. (2003).** Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. *YGAST* **125**, 1808–1817.
- Kato, T., Choi, Y., Elmowalid, G., Sapp, R. K., Barth, H., Furusaka, A., Mishiro, S., Wakita, T., Krawczynski, K. & Liang, T. J. (2008).** Hepatitis C virus JFH-1 strain infection in chimpanzees is associated with low pathogenicity and emergence of an adaptive mutation. *hepatology* **48**, 732–740.
- Kato, T., Furusaka, A., Miyamoto, M., Date, T., Yasui, K., Hiramoto, J., Nagayama, K., Tanaka, T. & Wakita, T. (2001).** Sequence analysis of hepatitis C virus isolated from a fulminant hepatitis patient. *Journal of Medical Virology* **64**, 334–339.
- Kaul, A., Stauffer, S., Berger, S., Pertel, T., Schmitt, J., Kallis, S., Zayas, M., Lohmann, V., Luban, J. & Bartenschlager, R. (2009).** Essential Role of Cyclophilin A for Hepatitis C Virus Replication and Virus Production and Possible Link to Polyprotein Cleavage Kinetics. *PLoS Pathogens* **5**. e1000546 . Public Library of Science.
- Kaul, A., Woerz, I., Meuleman, P., Leroux-Roels, G. & Bartenschlager, R. (2007).** Cell Culture Adaptation of Hepatitis C Virus and In Vivo Viability of an Adapted Variant. *Journal of Virology* **81**, 13168–13179.
- Kazarov, A. R., Yang, X., Stipp, C. S., Sehgal, B. & Hemler, M. E. (2002).** An extracellular site on tetraspanin CD151 determines alpha 3 and alpha 6 integrin-dependent cellular morphology. *J Cell Biol* **158**, 1299–1309.
- Keck, Z. Y., Saha, A., Xia, J., Wang, Y., Lau, P., Krey, T., Rey, F. A. & Fong, S. K. H. (2011).** Mapping a Region of Hepatitis C Virus E2 That Is Responsible for Escape from Neutralizing Antibodies and a Core CD81-Binding Region That Does Not Tolerate Neutralization Escape Mutations. *Journal of Virology* **85**, 10451–10463.
- Keck, Z.-Y., Xia, J., Cai, Z., Li, T.-K., Owsianka, A. M., Patel, A. H., Luo, G. & Fong, S. K. H. (2007).** Immunogenic and Functional Organization of Hepatitis C Virus (HCV) Glycoprotein E2 on Infectious HCV Virions. *Journal of Virology*. **81**, 1043–1047.

- Kettner, S., Kalthoff, F., Graf, P., Priller, E., Kricek, F., Lindley, I. & Schweighoffer, T. (2007).** EW1-2/CD316 Is an Inducible Receptor of HSPA8 on Human Dendritic Cells. *Molecular and Cellular Biology* **27**, 7718–7726. American Society for Microbiology (ASM).
- Kim, J. J., Lee, D. D. & Choe, J. J. (1999).** Hepatitis C virus NS5A protein is phosphorylated by casein kinase II. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **257**, 777–781.
- Kim, S. J., Kim, J. H., Kim, K. G., Lim, H. S. & Oh, J. W. (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., Kim, C. S., Lee, S. H. & Jang, S. K. (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.
- Kitadokoro, K., Bordo, D., Galli, G., Petracca, R., Falugi, F., Abrignani, S., Grandi, G. & Bolognesi, M. (2001).** CD81 extracellular domain 3D structure: insight into the tetraspanin superfamily structural motifs. *EMBO J* **20**, 12–18.
- Klade, C. S., Wedemeyer, H., Berg, T., Hinrichsen, H., Cholewinska, G., Zeuzem, S., Blum, H., Buschle, M., Jelovcan, S., & other authors. (2008).** Therapeutic vaccination of chronic hepatitis C nonresponder patients with the peptide vaccine IC41. *YGAST* **134**, 1385–1395.
- Klein, K. C., Dellos, S. R. & Lingappa, J. R. (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. Am Soc Microbiol.
- Koch, J. E. & Bartenschlager, R. (1999).** Modulation of Hepatitis C Virus NS5A Hyperphosphorylation by Nonstructural Proteins NS3, NS4A, and NS4B. *Trends in Cell Biology* **73**, 7138. American Society for Microbiology (ASM).
- Kohaar, I., Ploss, A., Korol, E., Mu, K., Schoggins, J. W., O'Brien, T. R., Rice, C. M. & Prokunina-Olsson, L. (2010).** Splicing Diversity of the Human OCLN Gene and Its Biological Significance for Hepatitis C Virus Entry. *Journal of Virology* **84**, 6987–6994. American Society for Microbiology (ASM).
- Koike, K., Moriya, K. & Matsuura, Y. (2010).** Animal models for hepatitis C and related liver disease. *Hepatology Research* **40**, 69–82.
- Kolesnikova, T. V., Kazarov, A. R., Lemieux, M. E., Lafleur, M. A., Kesari, S., Kung, A. L. & Hemler, M. E. (2009).** Glioblastoma Inhibition by Cell Surface Immunoglobulin Protein EW1-2, In Vitro and In Vivo. *Neoplasia* **11**, 77-86. Neoplasia Press.
- Kolesnikova, T. V., Stipp, C. S., Rao, R. M., Lane, W. S., Lusciuskas, F. W. & Hemler, M. E. (2004).** EW1-2 modulates lymphocyte integrin alpha4-beta1 functions. *Blood* **103**, 3013–3019.
- Kolykhalov, A. A., Agapov, E. V., Blight, K. J., Mihalik, K., Feinstone, S. M. & Rice, C. M. (1997).** Transmission of Hepatitis C by Intrahepatic Inoculation with Transcribed RNA. *Science* **277**, 570–574.
- Kolykhalov, A. A., Mihalik, K., Feinstone, S. M. & Rice, C. M. (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. Am Soc Microbiol.
- Koppel, E. A., Van Gisbergen, K. P. J. M., Geijtenbeek, T. B. H. & Van Kooyk, Y. (2005).** Distinct functions of DC-SIGN and its homologues L-SIGN (DC-SIGNR) and mSIGNR1 in pathogen recognition and immune regulation. *Cell Microbiol* **7**, 157–165.

- Korenaga, M., Hino, K., Katoh, Y., Yamaguchi, Y., Okuda, M., Yoshioka, K. & Okita, K. (2001).** A possible role of hypervariable region 1 quasispecies in escape of hepatitis C virus particles from neutralization. *J Viral Hepat* **8**, 331–340.
- Koutsoudakis, G., Herrmann, E., Kallis, S., Bartenschlager, R. & Pietschmann, T. (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.
- Koutsoudakis, G., Kaul, A., Steinmann, E., Kallis, S., Lohmann, V., Pietschmann, T. & Bartenschlager, R. (2006).** Characterization of the Early Steps of Hepatitis C Virus Infection by Using Luciferase Reporter Viruses. *Journal of Virology* **80**, 5308–5320.
- Kouyoumdjian, J. A., Morita, M. D. P. A., Sato, A. K. & Pissolatti, A. F. (2001).** Fatal rhabdomyolysis after acute sodium monensin (Rumensin®) toxicity: case report. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria* **59**, 596–598. Associação Arquivos de Neuro-Psiquiatria.
- Kovalenko, O. V., Yang, X. H. & Hemler, M. E. (2007).** A novel cysteine cross-linking method reveals a direct association between claudin-1 and tetraspanin CD9. *Mol Cell Proteomics*. **6.11**,1855-1867.
- Kovalenko, O. V., Yang, X., Kolesnikova, T. V. & Hemler, M. E. (2004).** Evidence for specific tetraspanin homodimers: inhibition of palmitoylation makes cysteine residues available for cross-linking. *Biochem J* **377**, 407–417.
- Krauss, O., Hollinshead, R., Hollinshead, M. & Smith, G. L. (2002).** An investigation of incorporation of cellular antigens into vaccinia virus particles. *J Gen Virol* **83**, 2347–2359.
- Krementsov, D. N., Weng, J., Lambel , M., Roy, N. H. & Thali, M. (2009).** Tetraspanins regulate cell-to-cell transmission of HIV-1. *Retrovirology* **6**, 64. BioMed Central.
- Krementsov, D. N., Rassam, P., Margeat, E., Roy, N. H., Schneider-Schaulies, J., Milhiet, P. E. & Thali, M. (2010).** HIV-1 Assembly Differentially Alters Dynamics and Partitioning of Tetraspanins and Raft Components. *Traffic* **11**, 1401–1414.
- Krey, T., d'Alayer, J., Kikuti, C. M., Saulnier, A., Damier-Piolle, L., Petitpas, I., Johansson, D. X., Tawar, R. G., Baron, B., & other authors. (2010).** The Disulfide Bonds in Glycoprotein E2 of Hepatitis C Virus Reveal the Tertiary Organization of the Molecule. *PLoS Pathogens* **6**, e1000762 (C. M. Rice, Ed.).
- Krieger, N., Lohmann, V. & Bartenschlager, R. (2001).** Enhancement of Hepatitis C Virus RNA Replication by Cell Culture-Adaptive Mutations. *Journal of Virology* **75**, 4614–4624. American Society for Microbiology (ASM).
- Krieger, S. E., Zeisel, M. B., Davis, C., Thumann, C., Harris, H. J., Schnober, E. K., Mee, C., Soulier, E., Royer, C., & other authors. (2010).** Inhibition of hepatitis C virus infection by anti-claudin-1 antibodies is mediated by neutralization of E2-CD81-Claudin-1 associations. *hepatology* **51**, 1144–1157.
- Kriegs, M., Burckstummer, T., Himmelsbach, K., Bruns, M., Frelin, L., Ahlen, G., Sallberg, M. & Hildt, E. (2009).** The Hepatitis C Virus Non-structural NS5A Protein Impairs Both the Innate and Adaptive Hepatic Immune Response in Vivo. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 28343–28351.
- Kuiken, C. & Simmonds, P. (2009).** Nomenclature and numbering of the hepatitis C virus. *Methods Mol Biol* **510**, 33–53.
- Kwon, H. & Lok, A. S. (2011).** Does antiviral therapy prevent hepatocellular carcinoma? *hepatology* **16**, 787–795.

- Lagaudrière-Gesbert, C. C., Lebel-Binay, S. S., Hubeau, C. C., Fradelizi, D. D. & Conjeaud, H. H. (1998).** Signaling through the tetraspanin CD82 triggers its association with the cytoskeleton leading to sustained morphological changes and T cell activation. *Eur J Immunol* **28**, 4332–4344.
- Lagging, L. M., Meyer, K., Owens, R. J. & Ray, R. (1998).** Functional Role of Hepatitis C Virus Chimeric Glycoproteins in the Infectivity of Pseudotyped Virus. *Trends in Cell Biology* **72**, 3539. American Society for Microbiology (ASM).
- Lai, C. K., Jeng, K. S., Machida, K. & Lai, M. M. C. (2008).** Association of Hepatitis C Virus Replication Complexes with Microtubules and Actin Filaments Is Dependent on the Interaction of NS3 and NS5A. *Journal of Virology* **82**, 8838–8848. American Society for Microbiology (ASM).
- Lai, M. E., Mazzoleni, A. P., Balestrieri, A., Argioli, F., De Virgilis, S., Cao, A., Purcell, R. H. & Farci, P. (1994).** Hepatitis C virus in multiple episodes of acute hepatitis in polytransfused thalassaemic children. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **343**, 388–390.
- Lai, W. K., Sun, P. J., Zhang, J., Jennings, A., Lalor, P. F., Hubscher, S., McKeating, J. A. & Adams, D. H. (2006).** Expression of DC-SIGN and DC-SIGNR on Human Sinusoidal Endothelium. *The American Journal of Pathology* **169**, 200–208.
- Lam, A. M. I. & Frick, D. N. (2006).** Hepatitis C Virus Subgenomic Replicon Requires an Active NS3 RNA Helicase. *Journal of Virology* **80**, 404–411. American Society for Microbiology (ASM).
- Lambot, M., Frétier, S., de Beeck, A. O., Quatannens, B., Lestavel, S., Clavey, V. & Dubuisson, J. (2002).** Reconstitution of hepatitis C virus envelope glycoproteins into liposomes as a surrogate model to study virus attachment. *J Biol Chem* **277**, 20625–20630.
- Lan, K.-H., Lan, K.-L., Lee, W.-P., Sheu, M.-L., Chen, M.-Y., Lee, Y.-L., Yen, S.-H., Chang, F.-Y. & Lee, S.-D. (2007).** HCV NS5A inhibits interferon- $\alpha$  signaling through suppression of STAT1 phosphorylation in hepatocyte-derived cell lines. *Journal of Hepatology* **46**, 759–767.
- Lanford, R. E., Guerra, B., Bigger, C. B., Lee, H., Chavez, D. & Brasky, K. M. (2007).** Lack of response to exogenous interferon- $\alpha$  in the liver of chimpanzees chronically infected with hepatitis C virus. *hepatology* **46**, 999–1008. Wiley Online Library.
- Lanford, R. E., Hildebrandt-Eriksen, E. S., Petri, A., Persson, R., Lindow, M., Munk, M. E., Kauppinen, S. & Orum, H. (2010).** Therapeutic Silencing of MicroRNA-122 in Primates with Chronic Hepatitis C Virus Infection. *Science* **327**, 198–201.
- Lanford, R. E., Guerra, B., Chavez, D., Bigger, C., Brasky, K. M., Wang, X.-H., Ray, S. C. & Thomas, D. L. (2004).** Cross-Genotype Immunity to Hepatitis C Virus. *Journal of Virology* **78**, 1575–1581.
- Lanford, R. E., Sureau, C., Jacob, J. R., White, R. & Fuerst, T. R. (1994).** Demonstration of in Vitro Infection of Chimpanzee Hepatocytes with Hepatitis C Virus Using Strand-Specific RT/PCR. *Virology* **202**, 606–614.
- Laperche, S., Le Marrec, N., Girault, A., Bouchardeau, F., Servant-Delmas, A., Maniez-Montreuil, M., Gallian, P., Levayer, T., Morel, P. & Simon, N. (2005).** Simultaneous Detection of Hepatitis C Virus (HCV) Core Antigen and Anti-HCV Antibodies Improves the Early Detection of HCV Infection. *Journal of Virology* **43**, 3877–3883. American Society for Microbiology (ASM).
- Lau, J. (2002).** Mechanism of action of ribavirin in the combination treatment of chronic HCV infection. *Nature Cell Biology* **35**, 1002–1009.

- Lavanchy, D. (2011).** Evolving epidemiology of hepatitis C virus. *Clinical Microbiology and Infection* **17**, 107–115.
- Lavanchy, D. (2009).** The global burden of hepatitis C. *Liver Int* **29 Suppl 1**, 74–81.
- Lavie, M., Voisset, C., Vu-Dac, N., Zurawski, V., Duverlie, G., Wychowski, C. & Dubuisson, J. (2006).** Serum amyloid A has antiviral activity against hepatitis C virus by inhibiting virus entry in a cell culture system. *hepatology* **44**, 1626–1634.
- Lavillette, D., Morice, Y., Germanidis, G., Donot, P., Soulier, A., Pagkalos, E., Sakellariou, G., Intrator, L., Bartosch, B., & other authors. (2005a).** 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., Pécheur, E. I., Donot, P., Fresquet, J., Molle, J., Corbau, R., Dreux, M., Penin, F. & Cosset, F. L. (2007).** Characterization of Fusion Determinants Points to the Involvement of Three Discrete Regions of Both E1 and E2 Glycoproteins in the Membrane Fusion Process of Hepatitis C Virus. *Journal of Virology* **81**, 8752–8765. American Society for Microbiology (ASM).
- Lavillette, D., Bartosch, B., Nourrisson, D., Verney, G., Cosset, F.-L., Penin, F. & Pécheur, E. I. (2006).** Hepatitis C virus glycoproteins mediate low pH-dependent membrane fusion with liposomes. *J Biol Chem* **281**, 3909–3917.
- Lavillette, D., Tarr, A. W., Voisset, C. C., Donot, P. G., Bartosch, B., Bain, C., Patel, A. H., Dubuisson, J., Ball, J. K. & Cosset, F. L. (2005b).** Characterization of host-range and cell entry properties of the major genotypes and subtypes of hepatitis C virus. *hepatology* **41**, 265–274.
- Lavine, M. D. & Arrizabalaga, G. (2011).** The Antibiotic Monensin Causes Cell Cycle Disruption of *Toxoplasma gondii* Mediated through the DNA Repair Enzyme TgMSH-1. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **55**, 745–755. American Society for Microbiology (ASM).
- Lavine, M. D. & Arrizabalaga, G. (2012).** Analysis of Monensin Sensitivity in *Toxoplasma gondii* Reveals Autophagy as a Mechanism for Drug Induced Death. *PLoS ONE* **7**, e42107 (I. Blader, Ed.). Public Library of Science.
- Le Naour, F., Rubinstein, E., Jasmin, C., Prenant, M. & Boucheix, C. (2000).** Severely Reduced Female Fertility on CD9-Deficient Mice. *Science*. **287**, 319–321.
- Lechner, F., Wong, D. K. H., Dunbar, P. R., Chapman, R., Chung, R. T., Dohrenwend, P., Robbins, G., Phillips, R., Klenerman, P. & Walker, B. D. (2000).** Analysis of Successful Immune Responses in Persons Infected with Hepatitis C Virus. *J Exp Med*. **191**, 1499–1512.
- Lee, S. R., Kardos, K. W., Schiff, E., Berne, C. A., Mounzer, K., Banks, A. T., Tatum, H. A., Friel, T. J., DeMicco, M. P., & other authors. (2011).** Evaluation of a new, rapid test for detecting HCV infection, suitable for use with blood or oral fluid. *Journal of Virological Methods* **172**, 27–31.
- Leitao, R. & Rodriguez, A. (2010).** Inhibition of Plasmodium sporozoites infection by targeting the host cell. *Experimental Parasitology* **126**, 273–277. Elsevier Inc.
- Levrero, M. (2006).** Viral hepatitis and liver cancer: the case of hepatitis C. *hepatology* **25**, 3834–3847. Nature Publishing Group.
- Levy, S. & Shoham, T. (2005a).** Protein-Protein Interactions in the Tetraspanin Web. *Physiology* **20**, 218–224.
- Levy, S. & Shoham, T. (2005b).** The tetraspanin web modulates immune-signalling complexes. *Nat Rev Immunol* **5**, 136–148.

- Li, G., Dziuba, N., Friedrich, B., Murray, J. L. & Ferguson, M. R. (2011).** A post-entry role for CD63 in early HIV-1 replication. *Virology* **412**, 315–324. NIH Public Access.
- Li, K., Chen, Z., Kato, N., Gale, M. & Lemon, S. M. (2005a).** Distinct Poly(I-C) and Virus-activated Signaling Pathways Leading to Interferon- Production in Hepatocytes. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 16739–16747.
- Li, X. D., Sun, L., Seth, R. B., Pineda, G. & Chen, Z. J. (2005b).** From the Cover: Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the mitochondria to evade innate immunity. *PNAS* **102**, 17717–17722.
- Lindenbach, B. D., Meuleman, P., Ploss, A., Vanwolleghem, T., Syder, A. J., McKeating, J. A., Lanford, R. E., Feinstone, S. M., Major, M. E., & other authors. (2006).** Cell culture-grown hepatitis C virus is infectious in vivo and can be recultured in vitro. *PNAS* **103**, 3805–3809.
- Lindenbach, B. D., Pragai, B. M., Montserret, R., Beran, R. K. F., Pyle, A. M., Penin, F. & Rice, C. M. (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. American Society for Microbiology (ASM).
- Lindenbach, B. D., Evans, M. J., Syder, A. J., Wölk, B., Tellinghuisen, T. L., Liu, C. C., Maruyama, T., Hynes, R. O., Burton, D. R., & other authors. (2005).** Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* **309**, 623–626.
- Lindenbach, B. D. & Rice, C. M. (2005).** Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature* **436**, 933–938. Nature Publishing Group.
- Lineberry, N., Su, L., Soares, L. & Fathman, C. G. (2008).** The single subunit transmembrane E3 ligase gene related to anergy in lymphocytes (GRAIL) captures and then ubiquitinates transmembrane proteins across the cell membrane. *J Biol Chem* **283**, 28497–28505.
- Lippincott-Schwartz, J., Altan-Bonnet, N. & Patterson, G. H. (2003).** Photobleaching and photoactivation: following protein dynamics in living cells. *Nature Cell Biology*. Suppl:S7-14.
- Liu, L., He, B., Liu, W. M., Zhou, D., Cox, J. V. & Zhang, X. A. (2007).** Tetraspanin CD151 Promotes Cell Migration by Regulating Integrin Trafficking. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 31631–31642.
- Liu, S., Yang, W., Shen, L., Turner, J. R., Coyne, C. B. & Wang, T. (2009).** 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, S., Xiao, L., Nelson, C. & Hagedorn, C. (2012).** A Cell Culture Adapted HCV JFH1 Variant That Increases Viral Titers and Permits the Production of High Titer Infectious Chimeric Reporter Viruses. *PLoS ONE*. **7**, e44965 (S. K. Jang, Ed.).
- Liu, S., Kuo, W., Yang, W., Liu, W., Gibson, G. A., Dorko, K., Watkins, S. C., Strom, S. C. & Wang, T. (2010).** The second extracellular loop dictates Occludin-mediated HCV entry. *PLoS ONE*. **407**, 160–170.
- Logvinoff, C., Major, M. E., Oldach, D., Heyward, S., Talal, A., Balfe, P., Feinstone, S. M., Alter, H., Rice, C. M. & McKeating, J. A. (2004).** Neutralizing antibody response during acute and chronic hepatitis C virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 10149–10154. National Academy of Sciences.
- Lohmann, V., Körner, F., Koch, J. O., Herian, U., Theilmann, L. & Bartenschlager, R. (1999).** Replication of Subgenomic Hepatitis C Virus RNAs in a Hepatoma Cell Line. *hepatology* **285**, 110–113.

- Loomba, R., Rivera, M. M., McBurney, R., Park, Y., Haynes-Williams, V., Reherrmann, B., Alter, H. J., Herrine, S. K., Liang, T. J., & other authors. (2010).** The natural history of acute hepatitis C: clinical presentation, laboratory findings and treatment outcomes. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* **33**, 559–565.
- Lorenz, I. C., Marcotrigiano, J., Dentzer, T. G. & Rice, C. M. (2006).** Structure of the catalytic domain of the hepatitis C virus NS2-3 protease. *Nature* **442**, 831–835.
- Lozach, P. Y., Amara, A., Bartosch, B., Virelizier, J. L., Arenzana-Seisdedos, F., Cosset, F. L. & Altmeyer, R. (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.
- Luik, P., Chew, C., Aittoniemi, J., Chang, J., Wentworth, P., Dwek, R. A., Biggin, P. C., Vénien-Bryan, C. & Zitzmann, N. (2009).** The 3-dimensional structure of a hepatitis C virus p7 ion channel by electron microscopy. *Proc Nat Acad Sct USA*. **106**, 12712–12716.
- Lundin, M., Monne, M., Widell, A., Heijne, von, G. & Persson, M. A. A. (2003).** Topology of the Membrane-Associated Hepatitis C Virus Protein NS4B. *Journal of Virology* **77**, 5428–5438.
- Lupberger, J., Zeisel, M. B., Xiao, F., Thumann, C., Fofana, I., Zona, L., Davis, C., Mee, C. J., Turek, M., & other authors. (2011).** EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy. *Nature Medicine*. doi:10.1038/nm.2341. Nature Publishing Group.
- Ma, Y., Anantpadma, M., Timpe, J. M., Shanmugam, S., Singh, S. M., Lemon, S. M. & Yi, M. (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.
- Ma, Y., Yates, J., Liang, Y., Lemon, S. M. & Yi, M. (2008).** NS3 helicase domains involved in infectious intracellular hepatitis C virus particle assembly. *Journal of Virology* **82**, 7624–7639.
- Macdonald, A. & Harris, M. (2004).** Hepatitis C virus NS5A: tales of a promiscuous protein. *Journal of General Virology* **85**, 2485–2502.
- Mahmoudi, N., Garcia-Domenech, R., Galvez, J., Farhati, K., Franetich, J. F., Sauerwein, R., Hannoun, L., Derouin, F., Danis, M. & Mazier, D. (2008).** New Active Drugs against Liver Stages of Plasmodium Predicted by Molecular Topology. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **52**, 1215–1220. American Society for Microbiology (ASM).
- Maillard, P., Huby, T., Andréo, U., Moreau, M., Chapman, J. & Budkowska, A. (2006).** The interaction of natural hepatitis C virus with human scavenger receptor SR-BI/Cla1 is mediated by ApoB-containing lipoproteins. *The FASEB Journal* **20**, 735–737.
- Major, M. E., Mihalik, K., Fernandez, J., Seidman, J., Kleiner, D., Kolykhalov, A. A., Rice, C. M. & Feinstone, S. M. (1999).** Long-Term Follow-Up of Chimpanzees Inoculated with the First Infectious Clone for Hepatitis C Virus. *Journal of Virology* **73**, 3317. American Society for Microbiology (ASM).
- Marnell, M. H., Stookey, M. & Draper, R. K. (1982).** Monensin blocks the transport of diphtheria toxin to the cell cytoplasm. *The Journal of Cell Biology* **93**, 57. The Rockefeller University Press.
- Marsh, M., Wellsted, J., Kern, H., Harms, E. & Helenius, A. (1982).** Monensin inhibits Semliki Forest virus penetration into culture cells. *Proc Nat Acad Sct USA* **79**, 5297. National Academy of Sciences.

- Martin, C., Nielsen, S. U., Ibrahim, S., Bassendine, M. F. & Toms, G. L. (2008).** Binding of liver derived, low density hepatitis C virus to human hepatoma cells. *Journal of Medical Virology* **80**, 816–823.
- Masaki, T., Suzuki, R., Murakami, K., Aizaki, H., Ishii, K., Murayama, A., Date, T., Matsuura, Y., Miyamura, T., & other authors. (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.
- Masciopinto, F. F., Campagnoli, S. S., Abrignani, S. S., Uematsu, Y. Y. & Pileri, P. P. (2001).** The small extracellular loop of CD81 is necessary for optimal surface expression of the large loop, a putative HCV receptor. *Virus Research* **80**, 1–10.
- Masciopinto, F., Freer, G., Burgio, V. L., Levy, S., Galli-Stampino, L., Bendinelli, M., Houghton, M., Abrignani, S. & Uematsu, Y. (2002).** Expression of Human CD81 in Transgenic Mice Does Not Confer Susceptibility to Hepatitis C Virus Infection. *Trends in Cell Biology* **304**, 187–196.
- Matsuura, Y., Tani, H., Suzuki, K., Kimura-Someya, T., Suzuki, R., Aizaki, H., Ishii, K., Moriishi, K., Robison, C. S., & other authors. (2001).** Characterization of Pseudotype VSV Possessing HCV Envelope Proteins. *Trends in Cell Biology* **286**, 263–275.
- Maurin, G., Fresquet, J., Granio, O., Wychowski, C., Cosset, F. L. & Lavillette, D. (2011).** Identification of Interactions in the E1E2 Heterodimer of Hepatitis C Virus Important for Cell Entry. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 23865–23876. American Society for Biochemistry and Molecular Biology.
- Maxfield, F. R. (1982).** Weak bases and ionophores rapidly and reversibly raise the pH of endocytic vesicles in cultured mouse fibroblasts. *The Journal of Cell Biology* **95**, 676. The Rockefeller University Press.
- McCaffrey, A., Ohashi, K., Meuse, L., Shen, S., Lancaster, A. M., Lukavsky, P. J., Sarnow, P. & Kav, M. A. (2002).** Determinants of Hepatitis C Translational Initiation in Vitro, in Cultured Cells and Mice. *Molecular Therapy* **5**, 676–684.
- McClure, M. O., Marsh, M. & Weiss, R. A. (1988).** Human immunodeficiency virus infection of CD4-bearing cells occurs by a pH-independent mechanism. *EMBO J* **7**, 513. Nature Publishing Group.
- McKeating, J. A., Zhang, L. Q., Logvinoff, C., Flint, M., Zhang, J., Yu, J., Butera, D., Ho, D. D., Dustin, L. B., & other authors. (2004).** Diverse Hepatitis C Virus Glycoproteins Mediate Viral Infection in a CD81-Dependent Manner. *Journal of Virology* **78**, 8496–8505.
- McLauchlan. (2000).** Properties of the hepatitis C virus core protein: a structural protein that modulates cellular processes. *Nature Cell Biology* **7**, 2–14.
- McLauchlan, J., Lemberg, M. K., Hope, G. & Martoglio, B. (2002).** Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *EMBO J* **21**, 3980–3988.
- McMullan, L. K., Grakoui, A., Evans, M. J., Mihalik, K., Puig, M., Branch, A. D., Feinstone, S. M. & Rice, C. M. (2007).** Evidence for a functional RNA element in the hepatitis C virus core gene. *PNAS* **104**, 2879–2884. National Academy of Sciences.
- Mee, C. J., Harris, H. J., Farquhar, M. J., Wilson, G., Reynolds, G., Davis, C., van IJzendoorn, S. C. D., Balfe, P. & McKeating, J. A. (2009).** Polarization Restricts Hepatitis C Virus Entry into HepG2 Hepatoma Cells. *Journal of Virology* **83**, 6211–6221.

- Mee, C. J., Farquhar, M. J., Harris, H. J., Hu, K., Ramma, W., Ahmed, A., Maurel, P., Bicknell, R., Balfe, P. & McKeating, J. A. (2010).** Hepatitis C Virus Infection Reduces Hepatocellular Polarity in a Vascular Endothelial Growth Factor-Dependent Manner. *Gastroenterology* **138**, 1134–1142.
- Mee, C. J., Grove, J., Harris, H. J., Hu, K., Balfe, P. & McKeating, J. A. (2008).** Effect of cell polarization on hepatitis C virus entry. *Journal of Virology* **82**, 461–470.
- Meertens, L., Bertaux, C., Cukierman, L., Cormier, E., Lavillette, D., Cosset, F. L. & Dragic, T. (2008).** The Tight Junction Proteins Claudin-1, -6, and -9 Are Entry Cofactors for Hepatitis C Virus. *Journal of Virology* **82**, 3555–3560.
- Meertens, L., Bertaux, C. & Dragic, T. (2006).** Hepatitis C Virus Entry Requires a Critical Postinternalization Step and Delivery to Early Endosomes via Clathrin-Coated Vesicles. *Journal of Virology* **80**, 11571–11578.
- Membreno, F. E. & Lawitz, E. J. (2011).** The HCV NS5B Nucleoside and Non-Nucleoside Inhibitors. *Clinics in Liver Disease* **15**, 611–626.
- Mercer, D. F., Schiller, D. E., Elliott, J. F., Douglas, D. N., Hao, C., Rinfret, A., Addison, W. R., Fischer, K. P., Churchill, T. A., & other authors. (2001).** Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nature Medicine* **7**, 927–933. Nature Publishing Group.
- Meuleman, P., Albecka, A., Belouzard, S., Vercauteren, K., Verhoye, L., Wychowski, C., Leroux-Roels, G., Palmer, K. E. & Dubuisson, J. (2011).** Griffithsin Has Antiviral Activity against Hepatitis C Virus. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **55**, 5159. American Society for Microbiology (ASM).
- Meuleman, P., Catanese, M. T., Verhoye, L., Desombere, I., Farhoudi, A., Jones, C. T., Sheahan, T., Grzyb, K., Cortese, R., & other authors. (2012).** A Human monoclonal antibody targeting scavenger receptor class B type I precludes hepatitis C virus infection and viral spread in vitro and in vivo. *hepatology* **55**, 364–372.
- Meuleman, P., Hesselgesser, J., Paulson, M., Vanwolleghem, T., Desombere, I., Reiser, H. & Leroux-Roels, G. (2008).** Anti-CD81 antibodies can prevent a hepatitis C virus infection in vivo. *hepatology* **48**, 1761–1768.
- Meuleman, P., Libbrecht, L., De Vos, R., de Hemptinne, B., Gevaert, K., Vandekerckhove, J., Roskams, T. & Leroux-Roels, G. (2005).** Morphological and biochemical characterization of a human liver in a uPA-SCID mouse chimera. *Journal of Hepatology* **41**, 847–856.
- Meunier, J. C., Engle, R. E., Faulk, K., Zhao, M., Bartosch, B., Alter, H., Emerson, S. U., Cosset, F. L., Purcell, R. H. & Bukh, J. (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.
- Meylan, E., Curran, J., Hofmann, K., Moradpour, D., Binder, M., Bartenschlager, R. & Tschopp, J. U. R. (2005).** Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Trends in Cell Biology* **437**, 1167–1172. Nature Publishing Group.
- Michalak, J. P., Wychowski, C., Choukhi, A., Meunier, J. C., Ung, S., Rice, C. M. & Dubuisson, J. (1997).** Characterization of truncated forms of hepatitis C virus glycoproteins. *J Gen Virol* **78 ( Pt 9)**, 2299–2306.
- Min, G., Wang, H., Sun, T. T. & Kong, X. P. (2006).** Structural basis for tetraspanin functions as revealed by the cryo-EM structure of uroplakin complexes at 6-Å resolution. *The Journal of Cell Biology* **173**, 975–983.

- Mittapalli, G. K., Zhao, F., Jackson, A., Gao, H., Lee, H., Chow, S., Kaur, M. P., Nguyen, N., Zamboni, R., & other authors. (2012).** Discovery of ITX 4520: A highly potent orally bioavailable hepatitis C virus entry inhibitor. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **22**, 4955–4961.
- Miyado, K., Yamada, G., Yamada, S., Hasuwa, H., Nakamura, Y., Ryu, F., Suzuki, K., Kosai, K., Inoue, K., & other authors. (2000).** Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilization. *Science* **287**, 321–324.
- Miyanari, Y., Atsuzawa, K., Usuda, N., Watashi, K., Hishiki, T., Zayas, M., Bartenschlager, R., Wakita, T., Hijikata, M. & Shimotohno, K. (2007).** The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nature Cell Biology* **9**, 1089–1097. Nature Publishing Group.
- Miyauchi, K., Kim, Y., Latinovic, O., Morozov, V. & Melikyan, G. B. (2009).** HIV Enters Cells via Endocytosis and Dynamin-Dependent Fusion with Endosomes. *Cell* **137**, 433–444. NIH Public Access.
- Molina, S., Castet, V., Fournier-Wirth, C., Pichard-Garcia, L., Avner, R., Harats, D., Roitelman, J., Barbaras, R., Graber, P., & other authors. (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.
- Molina, S., Castet, V., Pichard-Garcia, L., Wychowski, C., Meurs, E., Pascussi, J.-M., Sureau, C., Fabre, J.-M., SaCunha, A., & other authors. (2008).** Serum-Derived Hepatitis C Virus Infection of Primary Human Hepatocytes Is Tetraspanin CD81 Dependent. *Journal of Virology*. **82**, 569–574.
- Mollenhauer, H. H., Morré, D. J. & Rowe, L. D. (1990).** Alteration of intracellular traffic by monensin; mechanism, specificity and relationship to toxicity. *Biochim Biophys Acta*. **1031**, 225-46.
- Monk, P. N. & Partridge, L. J. (2012).** Tetraspanins: gateways for infection. *Infect Disord Drug Targets* **12**, 4–17.
- Montpellier, C., Tews, B. A., Poitrimole, J., Rocha-Perugini, V., D'Arienzo, V., Potel, J., Zhang, X. A., Rubinstein, E., Dubuisson, J. & Cocquerel, L. (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.
- Montserret, R., Saint, N., Vanbelle, C., Salvay, A. G., Simorre, J. P., Ebel, C., Sapay, N., Renisio, J. G., Böckmann, A., & other authors. (2010).** NMR Structure and Ion Channel Activity of the p7 Protein from Hepatitis C Virus. *J Biol Chem*. **285**, 31446-61.
- Moradpour, D., Englert, C., Wakita, T. & Wans, J. R. (1996).** Characterization of cell lines allowing tightly regulated expression of hepatitis C virus core protein. *Virology*. **222** (1), 51-63.
- Moradpour, D., Brass, V., Bieck, E., Friebe, P., Gosert, R., Blum, H. E., Bartenschlager, R., Penin, F. & Lohmann, V. (2004a).** Membrane Association of the RNA-Dependent RNA Polymerase Is Essential for Hepatitis C Virus RNA Replication. *Trends in Cell Biology* **78**, 13278–13284. American Society for Microbiology (ASM).
- Moradpour, D., Evans, M. J., Gosert, R., Yuan, Z., Blum, H. E., Goff, S. P., Lindenbach, B. D. & Rice, C. M. (2004b).** 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. American Society for Microbiology (ASM).

- Moradpour, D., Penin, F. & Rice, C. M. (2007).** Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Micro* **5**, 453–463.
- Moriya, K., Yotsuyanagi, H., Shintani, Y., Fujie, H., Ishibashi, K., Matsuura, Y., Miyamura, T. & Koike, K. (1997).** Hepatitis C virus core protein induces hepatic steatosis in transgenic mice. *Journal of General Virology*. **78**, 1527–1531.
- Moriya, K., Fujie, H., Shintani, Y., Yotsuyanagi, H., Tsutsumi, T., Ishibashi, K., Matsuura, Y., Kimura, S., Miyamura, T. & Koike, K. (1998).** The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nature Medicine* **4**, 1065–1067. Nature Publishing Group.
- Mota, M. M., Pradel, G., Vanderberg, J. P., Hafalla, J., Frevert, U., Nussenzweig, R. S., Nussenzweig, V. & Rodriguez, A. (2001).** Migration of Plasmodium Sporozoites Through Cells Before Infection. *Science* **291**, 141–144.
- Muroi, M., Suehara, K., Wakusawa, H., Suzuki, K., Sato, T., Nishimura, T., Otake, N. & Takatsuki, A. (1996).** Novel blockade of cell surface expression of virus glycoproteins by leucinstatin A. *J Antibiot* **49**, 1119–1126.
- Murphy, D., Chamberland, J., Dandavino, R. & Sablon, E. (2007).** A new genotype of hepatitis C virus originating from central Africa. *hepatology*. **46**:623A.
- Nakajima, H., Cocquerel, L., Kiyokawa, N., Fujimoto, J. & Levy, S. (2005).** Kinetics of HCV envelope proteins' interaction with CD81 large extracellular loop. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **328**, 1091–1100.
- Nascimbeni, M., Mizukoshi, E., Bosmann, M., Major, M. E., Mihalik, K., Rice, C. M., Feinstone, S. M. & Rehermann, B. (2003).** Kinetics of CD4+ and CD8+ Memory T-Cell Responses during Hepatitis C Virus Rechallenge of Previously Recovered Chimpanzees. *Journal of Virology*. **77**, 4781–4793.
- Nava, P., López, S., Arias, C. F., Islas, S. & González-Mariscal, L. (2004).** The rotavirus surface protein VP8 modulates the gate and fence function of tight junctions in epithelial cells. *Journal of Cell Science* **117**, 5509–5519.
- Neumann-Haefelin, C., Blum, H. E., Chisari, F. V. & Thimme, R. (2005).** T cell response in hepatitis C virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **32**, 75–85.
- Nguyen, H., Sankaran, S. & Dandekar, S. (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., Bassendine, M. F., Burt, A. D., Martin, C., Pumeechockchai, W. & Toms, G. L. (2006).** Association between Hepatitis C Virus and Very-Low-Density Lipoprotein (VLDL)/LDL Analyzed in Iodixanol Density Gradients. *Journal of Virology* **80**, 2418–2428. American Society for Microbiology (ASM).
- Niepmann, M. (2009).** Activation of hepatitis c virus translation by a liver-specific microRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **8**, 1473–1477. Landes Bioscience.
- Nitta, S., Sakamoto, N., Nakagawa, M., Kakinuma, S., Mishima, K., Kusano-Kitazume, A., Kiyohashi, K., Murakawa, M., Nishimura-Sakurai, Y., & other authors. (2012).** Hepatitis C virus NS4B protein targets STING and abrogates RIG-I-mediated type-I interferon-dependent innate immunity. *Trends in Cell Biology*. doi: 10.1002/hep.26017.
- Noppornpanth, S., Lien, T. X., Poovorawan, Y., Smits, S. L., Osterhaus, A. D. M. E. & Haagmans, B. L. (2006).** Identification of a Naturally Occurring Recombinant Genotype 2/6 Hepatitis C Virus. *Journal of Virology* **80**, 7569–7577.

- Nydegger, S., Khurana, S., Kremmentsov, D. N., Foti, M. & Thali, M. (2006).** Mapping of tetraspanin-enriched microdomains that can function as gateways for HIV-1. *J Cell Biol* **173**, 795–807.
- Odintsova, E., Voortman, J., Gilbert E. & Berditchevski F (2003).** Tetraspanin CD82 regulates compartmentalisation and ligand-induced dimerization of EGFR. *Journal of Cell Science* **116**, 4557–4566.
- Odintsova, E., Sugiura, T. & Berditchevski, F. (2000).** Attenuation of EGF receptor signaling by a metastasis suppressor, the tetraspanin CD82/KAI-1. *Curr Biol* **10**, 1009–1012.
- Odintsova, E., Butters, T. D., Monti, E., Sprong, H., van Meer, G. & Berditchevski, F. (2006).** Gangliosides play an important role in the organization of CD82-enriched microdomains. *Biochem J* **400**, 315.
- Okamoto, K., Mori, Y., Komoda, Y., Okamoto, T., Okochi, M., Takeda, M., Suzuki, T., Moriishi, K. & Matsuura, Y. (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.
- Ono, M., Handa, K., Sonnino, S., Withers, D. A., Nagai, H. & Hakomori, S.-I. (2001).** GM3 Ganglioside Inhibits CD9-Facilitated Haptotactic Cell Motility: Coexpression of GM3 and CD9 Is Essential in the Downregulation of Tumor Cell Motility and Malignancy †. *Biochemistry* **40**, 6414–6421. American Chemical Society.
- Op de Beeck, A., Voisset, C., Bartosch, B., Ciczora, Y., Cocquerel, L., Keck, Z., Fong, S., Cosset, F. L. & Dubuisson, J. (2004).** Characterization of Functional Hepatitis C Virus Envelope Glycoproteins. *Journal of Virology* **78**, 2994–3002. American Society for Microbiology (ASM).
- Oren, R., Takahashi, S., Doss, C., Levy, R. & Levy, S. (1990).** TAPA-1, the target of an antiproliferative antibody, defines a new family of transmembrane proteins. *Molecular and Cellular Biology* **10**, 4007–4015.
- Orlicky, D. J. (1996).** Negative regulatory activity of a prostaglandin F<sub>2</sub>α receptor associated protein (FPRP). *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* **54**, 247–259.
- Owen, D. M., Huang, H., Ye, J. & Gale, M., Jr. (2009).** Apolipoprotein E on hepatitis C virion facilitates infection through interaction with low-density lipoprotein receptor. *Virology* **394**, 99–108.
- Owsianka, A. M., Tarr, A. W., Keck, Z. Y., Li, T. K., Witteveldt, J., Adair, R., Fong, S. K. H., Ball, J. K. & Patel, A. H. (2008).** Broadly neutralizing human monoclonal antibodies to the hepatitis C virus E2 glycoprotein. *Journal of General Virology* **89**, 653–659.
- Owsianka, A. M., Timms, J. M., Tarr, A. W., Brown, R. J. P., Hickling, T. P., Szwejk, A., Bienkowska-Szewczyk, K., Thomson, B. J., Patel, A. H. & Ball, J. K. (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.
- Owsianka, A., Clayton, R. F., Loomis-Price, L. D., McKeating, J. A. & Patel, A. H. (2001).** Functional analysis of hepatitis C virus E2 glycoproteins and virus-like particles reveals structural dissimilarities between different forms of E2. *J Gen Virol* **82**, 1877–1883.

- Owsianka, A., Tarr, A. W., Juttla, V. S., Lavillette, D., Bartosch, B., Cosset, F. L., Ball, J. K. & Patel, A. H. (2005).** Monoclonal Antibody AP33 Defines a Broadly Neutralizing Epitope on the Hepatitis C Virus E2 Envelope Glycoprotein. *Journal of Virology* **79**, 11095–11104. American Society for Microbiology (ASM).
- Pang, P. S., Jankowsky, E., Planet, P. J. & Pyle, A. M. (2002).** The hepatitis C viral NS3 protein is a processive DNA helicase with cofactor enhanced RNA unwinding. *EMBO J* **21**, 1168–1176.
- Park, C. Y., Jun, H. J., Wakita, T., Cheong, J. H. & Hwang, S. B. (2009).** Hepatitis C Virus Nonstructural 4B Protein Modulates Sterol Regulatory Element-binding Protein Signaling via the AKT Pathway. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 9237–9246.
- Patel, A. H., Wood, J., Penin, F., Dubuisson, J. & McKeating, J. A. (2000).** Construction and characterization of chimeric hepatitis C virus E2 glycoproteins: analysis of regions critical for glycoprotein aggregation and CD81 binding. *J Gen Virol* **81**, 2873–2883.
- Pavlovic, D., Neville, D., Argaud, O., Blumberg, O., Dwek, R. A., Fischer, W. B. & Zitzmann, N. (2003).** The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain iminosugar derivatives. *Proc Nat Acad Sct USA* **100**, 6104–6108.
- Pawlotsky, J. M. (2003).** Hepatitis C virus genetic variability: pathogenic and clinical implications. *Clinics in Liver Disease*. **7**, 45-66.
- Pawlotsky, J. M., Germanidis, G., Frainais, P. O., Bouvier, M., Soulier, A., Pellerin, M. & Dhumeaux, D. (1999).** Evolution of the Hepatitis C Virus Second Envelope Protein Hypervariable Region in Chronically Infected Patients Receiving Alpha Interferon Therapy. *Journal of Virology* **73**, 6490. American Society for Microbiology (ASM).
- Pawlotsky, J.-M. (2002).** Molecular diagnosis of viral hepatitis. *YGASt* **122**, 1554–1568.
- Pawlotsky, J.-M., Chevaliez, S. & McHutchison, J. G. (2007).** The Hepatitis C Virus Life Cycle as a Target for New Antiviral Therapies. *Gastroenterology* **132**, 1979–1998.
- Penin, F., Combet, C., Germanidis, G., Frainais, P. O., Deleage, G. & Pawlotsky, J. M. (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., Brass, V., Appel, N., Ramboarina, S., Montserret, R., Ficheux, D., Blum, H. E., Bartenschlager, R. & Moradpour, D. (2004).** Structure and Function of the Membrane Anchor Domain of Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5A. *J Biol Chem*. **279**, 40835–40843.
- Pestka, J. M., Morice, Y., Zeisel, M. B., Germanidis, G., Blaser, E., Donot, P., Schurmann, P., Soulier, A., Bartosch, B., & other authors. (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.
- Pestova, T. V., Shatsky, I. N., Fletcher, S. P., Jackson, R. J. & Hellen, C. U. T. (1998).** A prokaryotic-like mode of cytoplasmic eukaryotic ribosome binding to the initiation codon during internal translation initiation of hepatitis C and classical swine fever virus RNAs. *Genes & Development* **12**, 67–83. Cold Spring Harbor Lab.
- Petracca, R., Falugi, F., Galli, G., Norais, N., Rosa, D., Campagnoli, S., Burgio, V., Di Stasio, E., Giardana, B., & other authors. (2000).** Structure-Function Analysis of Hepatitis C Virus Envelope-CD81 Binding. *Journal of Virology* **74**, 4824. American Society for Microbiology (ASM).

- Pietrogrande, M., De Vita, S., Zignego, A. L., Pioltelli, P., Sansonno, D., Sollima, S., Atzeni, F., Saccardo, F., Quartuccio, L., & other authors. (2011).** Recommendations for the management of mixed cryoglobulinemia syndrome in hepatitis C virus-infected patients. *Nature Cell Biology* **10**, 444–454.
- Pietschmann, T., Lohmann, V., Kaul, A., Krieger, N., Rinck, G., Rutter, G., Strand, D. & Bartenschlager, R. (2002).** Persistent and Transient Replication of Full-Length Hepatitis C Virus Genomes in Cell Culture. *Journal of Virology* **76**, 4008–4021.
- Pietschmann, T. T., Kaul, A. A., Koutsoudakis, G. G., Shavinskaya, A. A., Kallis, S. S., Steinmann, E. E., Abid, K. K., Negro, F. F., Dreux, M. M., & other authors. (2006).** Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 7408–7413.
- Pileri, P., Uematsu, Y., Campagnoli, S., Galli, G., Falugi, F., Petracca, R., Weiner, A. J., Houghton, M., Rosa, D., & other authors. (1998).** Binding of Hepatitis C Virus to CD81. *Science* **282**, 938–941.
- Ploss, A. A. & Dubuisson, J. J. (2012).** New advances in the molecular biology of hepatitis C virus infection: towards the identification of new treatment targets. *Gut* **61 Suppl 1**, i25–i35.
- Ploss, A., Evans, M. J., Gaysinskaya, V. A., Panis, M., You, H., de Jong, Y. P. & Rice, C. M. (2009).** Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature* **457**, 882–886. Nature Publishing Group.
- Ploss, A. & Rice, C. M. (2009).** Towards a small animal model for hepatitis C. *EMBO Rep* **10**, 1220–1227.
- Podevin, P., Carpentier, A., Pène, V., Aoudjehane, L., Carrière, M., Zaïdi, S., Hernandez, C., Calle, V., Méritet, J. F., & other authors. (2010).** Production of Infectious Hepatitis C Virus in Primary Cultures of Human Adult Hepatocytes. *YGAST*. doi:10.1053. AGA Institute American Gastroenterological Association.
- Pohlmann, R., Krüger, S., Hasilik, A. & Figura, Von, K. (1984).** Effect of monensin on intracellular transport and receptor-mediated endocytosis of lysosomal enzymes. *Biochem J* **217**, 649. Portland Press Ltd.
- Pohlmann, S., Zhang, J., Baribaud, F., Chen, Z., Leslie, G. J., Lin, G., Graneli-Piperno, A., Doms, R. W., Rice, C. M. & McKeating, J. A. (2003).** Hepatitis C Virus Glycoproteins Interact with DC-SIGN and DC-SIGNR. *Journal of Virology* **77**, 4070–4080. American Society for Microbiology (ASM).
- Polyak, S. J., McCardle, S., Liu, S. L., Sullivan, D. G., Chung, M., Hofgärtner, W. T., Carithers, R. L., McMahon, B. J., Mullins, J. I., & other authors. (1998).** Evolution of Hepatitis C Virus Quasispecies in Hypervariable Region 1 and the Putative Interferon Sensitivity-Determining Region during Interferon Therapy and Natural Infection. *Journal of Virology* **72**, 4288. American Society for Microbiology (ASM).
- Polyak, S. J., Khabar, K. S. A., Paschal, D. M., Ezelle, H. J., Duverlie, G., Barber, G. N., Levy, D. E., Mukaida, N. & Gretch, D. R. (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., McCone, J., Jr., Bacon, B. R., Bruno, S., Manns, M. P., Sulkowski, M. S., Jacobson, I. M., Reddy, K. R., Goodman, Z. D., & other authors. (2011).** Boceprevir for Untreated Chronic HCV Genotype 1 Infection. *PLoS ONE* **364**, 1195–1206.

- Popescu, C.-I., Callens, N., Trinel, D., Roingeard, P., Moradpour, D., Descamps, V., Duverlie, G., Penin, F., Héliot, L., & other authors. (2011).** NS2 Protein of Hepatitis C Virus Interacts with Structural and Non-Structural Proteins towards Virus Assembly. *PLoS Pathogens* **7**, e1001278 (C. M. Walker, Ed.).
- Popescu, C.-I. & Dubuisson, J. (2010).** Role of lipid metabolism in hepatitis C virus assembly and entry. *Biology of the cell* **102**, 63–74.
- Post, J. J., Pan, Y., Freeman, A. J., Harvey, C. E., White, P. A., Palladinetti, P., Haber, P. S., Marinos, G., Levy, M. H., & other authors. (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. *The Journal of Infectious Diseases*. **189**, 1846-1855.
- Powner, D., Kopp, P. M., Monkley, S. J., Critchley, D. R. & Berditchevski, F. (2011).** Tetraspanin CD9 in cell migration. *Biochem Soc Trans* **39**, 563–567.
- Poynard, T., Yuen, M.-F., Ratziu, V. & Lai, C. L. (2003).** Viral hepatitis C. *Lancet* **362**, 2095–2100.
- Prince, A. M., Brotman, B., Grady, G. F., Kuhns, W. J., Hazzi, C., Levine, R. W. & Millian, S. L. (1974).** Long-incubation post-transfusion hepatitis without serological evidence of exposure to hepatitis-B virus. *Lancet*. **2**, 241-246.
- Rai, R. & Deval, J. (2011).** New opportunities in anti-hepatitis C virus drug discovery: Targeting NS4B. *Trends in Cell Biology* **90**, 93–101.
- Rajesh, S., Sridhar, P., Tews, B. A., Fénéant, L., Cocquerel, L., Ward, D. G., Berditchevski, F. & Overduin, M. (2012).** Structural Basis of Ligand Interactions of the Large Extracellular Domain of Tetraspanin CD81. *Journal of Virology*. **86**, 9606–9616.
- Rana, S. & Zöller, M. (2011).** Exosome target cell selection and the importance of exosomal tetraspanins: a hypothesis. *Biochem Soc Trans* **39**, 559–562.
- Reesink, H. W., Zeuzem, S., Weegink, C. J., Forestier, N., Van Vlier, A., van de Wetering de Rooij, J., McNair, L., Purdy, S., Kauffman, R., & other authors. (2006).** Rapid Decline of Viral RNA in Hepatitis C Patients Treated With VX-950: A Phase Ib, Placebo-Controlled, Randomized Study. *Gastroenterology* **131**, 997–1002.
- Rehermann, B. (2009).** Hepatitis C virus versus innate and adaptive immune responses: a tale of coevolution and coexistence. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **119**, 1745. American Society for Clinical Investigation.
- Rhainds, D. & Brissette, L. (2004).** The role of scavenger receptor class B type I (SR-BI) in lipid trafficking. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **36**, 39–77.
- Robertson, B., Myers, G., Howard, C., Brettin, T., Bukh, J., Gaschen, B., Gojobori, T., Maertens, G., Mizokami, M., & other authors. (1998).** Classification, nomenclature, and database development for hepatitis C virus (HCV) and related viruses : proposals for standardization. International Committee on Virus Taxonomy. *Archives of Virology*. **143**, 2493-503.
- Roccasecca, R., Ansuini, H., Vitelli, A., Meola, A., Scarselli, E., Acali, S., Pezzanera, M., Ercole, B. B., McKeating, J., & other authors. (2003).** Binding of the Hepatitis C Virus E2 Glycoprotein to CD81 Is Strain Specific and Is Modulated by a Complex Interplay between Hypervariable Regions 1 and 2. *Journal of Virology* **77**, 1856–1867. American Society for Microbiology (ASM).

- Rocha-Perugini, V., Lavie, M., Delgrange, D., Canton, J., Pillez, A., Potel, J., Lecoeur, C., Rubinstein, E., Dubuisson, J., & other authors. (2009).** The association of CD81 with tetraspanin-enriched microdomains is not essential for Hepatitis C virus entry. *BMC Microbiol* **9**, 111.
- Rocha-Perugini, V., Montpellier, C., Delgrange, D., Wychowski, C., Helle, F., Pillez, A., Drobecq, H., Le Naour, F., Charrin, S., & other authors. (2008).** The CD81 Partner EWI-2wint Inhibits Hepatitis C Virus Entry. *PLoS ONE*. **3**, e1866 (N. Papavasiliou, Ed.).
- Roohvand, F., Maidens, C., Lavergne, J. P., Boulant, S., Walic, M., Andreo, U., Goueslain, L., Helle, F., Mallet, A., & other authors. (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.
- Rosen, H. R., Miner, C., Sasaki, A. W., Lewinsohn, D. M., Conrad, A. J., Bakke, A., Bouwer, H. G. & Hinrichs, D. J. (2002).** Frequencies of HCV-specific effector CD4+ T cells by flow cytometry: Correlation with clinical disease stages. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **35**, 190–198.
- Rothwangl, K. B., Manicassamy, B., Uprichard, S. L. & Rong, L. (2008).** Dissecting the role of putative CD81 binding regions of E2 in mediating HCV entry: Putative CD81 binding region 1 is not involved in CD81 binding. *Virology* **5**, 46.
- Rouillé, Y., Helle, F., Delgrange, D., Roingeard, P., Voisset, C., Blanchard, E., Belouzard, S., McKeating, J., Patel, A. H., & other authors. (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.
- Rous, B. A., Reaves, B. J., Ihrke, G., Briggs, J., Gray, S. R., Stephens, D. J., Banting, G. & Luzio, J. P. (2002).** Role of Adaptor Complex AP-3 in Targeting Wild-Type and Mutated CD63 to Lysosomes. *Mol Biol Cell* **13**, 1071–1082. American Society for Cell Biology.
- Rubinstein, E., Le Naour, F., Lagaudrière-Gesbert, C., Billard, M., Conjeaud, H. & Boucheix, C. (1996).** CD9, CD63, CD81, and CD82 are components of a surface tetraspan network connected to HLA-DR and VLA integrins. *Eur J Immunol* **26**, 2657–2665.
- Rubín, A., Aguilera, V. & Berenguer, M. (2011).** Liver transplantation and hepatitis C. *hepatology* **35**, 805–812.
- Rumin, S., Berthillon, P., Tanaka, E., Kiyosawa, K., Trabaud, M.-A., Bizollon, T., Gouillat, C., Gripon, P., Guguen-Guillouzo, C., & other authors. (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.
- Runge, K. E. K., Evans, J. E. J., He, Z.-Y. Z., Gupta, S. S., McDonald, K. L. K., Stahlberg, H. H., Primakoff, P. P. & Myles, D. G. D. (2007).** Oocyte CD9 is enriched on the microvillar membrane and required for normal microvillar shape and distribution. *Dev Biol* **304**, 9–9.
- Russ, W. P. & Engelman, D. M. (2000).** The GxxxG motif: a framework for transmembrane helix-helix association. *Journal of Molecular Biology* **296**, 911–919. Elsevier Science.
- Russel, R. S., Meunier, J.-C., Takikawa, S., Faulk, K., Engle, R. E., Bukh, J., Purcell, R. H. & Emerson, S. U. (2008).** Advantages of a single-cycle production assay to study cell culture-adaptive mutations of hepatitis C virus. *PNAS*. **105**, 4370–4375.

- Russell, R. S., Kawaguchi, K., Meunier, J. C., Takikawa, S., Faulk, K., Bukh, J., Purcell, R. H. & Emerson, S. U. (2009).** Mutational analysis of the hepatitis C virus E1 glycoprotein in retroviral pseudoparticles and cell-culture-derived H77/JFH1 chimeric infectious virus particles. *Nature Cell Biology* **16**, 621–632.
- Rustan, A. C., Nossen, J. O., Berg, T. & Drevon, C. A. (1985).** The effects of monensin on secretion of very-low-density lipoprotein and metabolism of asialofetuin by cultured rat hepatocytes. *Biochem J* **227**, 529–536.
- Saeed, M., Shiina, M., Date, T., Akazawa, D., Watanabe, N., Murayama, A., Suzuki, T., Watanabe, H., Hiraga, N., & other authors. (2011).** In vivo adaptation of hepatitis C virus in chimpanzees for efficient virus production and evasion of apoptosis. *hepatology* **54**, 425–433. NIH Public Access.
- Sainz, B., Barretto, N., Martin, D. N., Hiraga, N., Imamura, M., Hussain, S., Marsh, K. A., Yu, X., Chayama, K., & other authors. (2012).** Identification of the Niemann-Pick C1-like 1 cholesterol absorption receptor as a new hepatitis C virus entry factor. *Nature Medicine*. doi:10.1038/nm.2581. Nature Publishing Group.
- Sakai, A., Claire, M. S., Faulk, K., Govindarajan, S. G., Emerson, S. U., Purcell, R. H. & Bukh, J. (2003).** The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 11646–11651.
- Sala-Valdes, M., Ursa, A., Charrin, S., Rubinstein, E., Hemler, M. E., Sanchez-Madrid, F. & Yañez-Mó, M. (2006).** EWI-2 and EWI-F Link the Tetraspanin Web to the Actin Cytoskeleton through Their Direct Association with Ezrin-Radixin-Moesin Proteins. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 19665–19675.
- Sala-Valdés, M., Ailane, N., Greco, C., Rubinstein, E. & Boucheix, C. (2012).** Targeting tetraspanins in cancer. *Expert Opin Ther Targets* **16**, 985–997.
- Salloum, S. & Tai, A. W. (2012).** Treating hepatitis C infection by targeting the host. *Translational Research* **159**, 421–429.
- Sandrin, V., Boulanger, P., Penin, F., Granier, C., Cosset, F. L. & Bartosch, B. (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.
- Santantonio, T., Fasano, M., Sinisi, E., Guastadisegni, A., Casalino, C., Mazzola, M., Francavilla, R. & Pastore, G. (2005).** Efficacy of a 24-week course of PEG-interferon alpha-2b monotherapy in patients with acute hepatitis C after failure of spontaneous clearance. *Journal of Hepatology* **42**, 329–333.
- Santantonio, T., Wiegand, J. & Tilman Gerlach, J. (2008).** Acute hepatitis C: Current status and remaining challenges. *Journal of Hepatology* **49**, 625–633.
- Santolini, E. E., Migliaccio, G. G. & La Monica, N. N. (1994).** Biosynthesis and biochemical properties of the hepatitis C virus core protein. *Journal of Virology* **68**, 3631–3641.
- Sato, K., Aoki, J., Misawa, N., Daikoku, E., Sano, K., Tanaka, Y. & Koyanagi, Y. (2008).** Modulation of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infectivity through Incorporation of Tetraspanin Proteins. *Journal of Virology* **82**, 1021–1033.
- Satoh, S., Hirota, M., Noguchi, T., Hijikata, M., Handa, H. & Shimotohno, K. (2000).** Cleavage of Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5A by a Caspase-like Protease(s) in Mammalian Cells. *Virology* **270**, 476–487.
- Saunier, B., Triyatni, M., Ulianich, L., Maruvada, P., Yen, P. & Kohn, L. D. (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.

- Scarselli, E., Ansuini, H. & Cerino, R. (2002).** *The human scavenger receptor class B type 1 is a novel candidate receptor for Hepatitis C Virus.* The EMBO Journal.
- Schaefer, E. A. K. & Chung, R. T. (2012).** Anti-Hepatitis C Virus Drugs in Development. *Gastroenterology* **142**, 1340–1350.e1.
- Schaller, T., Appel, N., Koutsoudakis, G., Kallis, S., Lohmann, V., Pietschmann, T. & Bartenschlager, R. (2007).** Analysis of Hepatitis C Virus Superinfection Exclusion by Using Novel Fluorochrome Gene-Tagged Viral Genomes. *Journal of Virology* **81**, 4591–4603. American Society for Microbiology (ASM).
- Schmidt-Mende, J., Bieck, E., Hugle, T., Penin, F., Rice, C. M., Blum, H. E. & Moradpour, D. (2001).** Determinants for membrane association of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *J Biol Chem* **276**, 44052–44063.
- Schmitt, M., Scrima, N., Radujkovic, D., Caillet-Saguy, C., Simister, P. C., Friebe, P., Wicht, O., Klein, R., Bartenschlager, R., & other authors. (2011).** A comprehensive structure-function comparison of hepatitis C virus strain JFH1 and J6 polymerases reveals a key residue stimulating replication in cell culture across genotypes. *Journal of Virology* **85**, 2565–2581.
- Schwartz-Albiez, R., Dörken, B., Hofmann, W. & Moldenhauer, G. (1988).** The B cell-associated CD37 antigen (gp40-52). Structure and subcellular expression of an extensively glycosylated glycoprotein. *J Immunol* **140**, 905–914.
- Seehafer, J. G., Tang, S. C., Slupsky, J. R. & Shaw, A. R. (1988).** The functional glycoprotein CD9 is variably acylated: localization of the variably acylated region to a membrane-associated peptide containing the binding site for the agonistic monoclonal antibody 50H.19. *Biochim Biophys Acta.* **957**, 399-410.
- Segura, M. M., Garnier, A., Di Falco, M. R., Whissell, G., Meneses-Acosta, A., Arcand, N. & Kamen, A. (2008).** Identification of Host Proteins Associated with Retroviral Vector Particles by Proteomic Analysis of Highly Purified Vector Preparations. *Journal of Virology* **82**, 1107–1117. American Society for Microbiology (ASM).
- Seigneuret, M. (2001).** Structure of the Tetraspanin Main Extracellular Domain. A PARTIALLY CONSERVED FOLD WITH A STRUCTURALLY VARIABLE DOMAIN INSERTION. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 40055–40064.
- Seigneuret, M. (2006).** Complete Predicted Three-Dimensional Structure of the Facilitator Transmembrane Protein and Hepatitis C Virus Receptor CD81: Conserved and Variable Structural Domains in the Tetraspanin Superfamily. *Biophysical Journal* **90**, 212–227. The Biophysical Society.
- Serebrov, V. & Pyle, A. M. (2004).** Periodic cycles of RNA unwinding and pausing by hepatitis C virus NS3 helicase. *Nature* **430**, 476–480.
- Serru, V., Le Naour, F., Billard, M., Azorsa, D. O., Lanza, F., Boucheix, C. & Rubinstein, E. (1999).** *Selective tetraspan-integrin complexes (CD81/alpha4beta1, CD151/alpha3beta1, CD151/alpha6beta1) under conditions disrupting tetraspan interactions.* *Biochem. J.* **340**, 103-111.
- Sharma, N. R., Mateu, G., Dreux, M., Grakoui, A., Cosset, F.-L. & Melikyan, G. B. (2011).** Hepatitis C virus is primed by CD81 protein for low pH-dependent fusion. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 30361–30376.
- Shaw, M. L., McLauchlan, J., Mills, P. R., Patel, A. H. & McCrudden, E. A. B. (2003).** Characterisation of the differences between hepatitis C virus genotype 3 and 1 glycoproteins. *Journal of Medical Virology* **70**, 361–372.
- Shaw, M. L., Stone, K. L., Colangelo, C. M., Gulcicek, E. E. & Palese, P. (2008).** Cellular Proteins in Influenza Virus Particles. *PLoS Pathogens* **4**, e1000085. Public Library of Science.

- Shawky, S. M., Bald, D. & Azzazy, H. M. E. (2010).** Direct detection of unamplified hepatitis C virus RNA using unmodified gold nanoparticles. *hepatology* **43**, 1163–1168.
- Shepard, C. W., Finelli, L. & Alter, M. J. (2005).** Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis* **5**, 558–567.
- Shimizu, Y. K. Y., Igarashi, H. H., Kiyohara, T. T., Shapiro, M. M., Wong, D. C. D., Purcell, R. H. R. & Yoshikura, H. H. (1998).** Infection of a chimpanzee with hepatitis C virus grown in cell culture. *J Gen Virol* **79** ( Pt 6), 1383–1386.
- Shirota, Y., Luo, H., Qin, W., Kaneko, S., Yamashita, T., Kobayashi, K. & Murakami, S. (2002).** Hepatitis C Virus (HCV) NS5A Binds RNA-dependent RNA Polymerase (RdRP) NS5B and Modulates RNA-dependent RNA Polymerase Activity. *J Biol Chem* **277**, 11149–11155.
- Shoham, T., Rajapaksa, R., Kuo, C. C., Haimovich, J. & Levy, S. (2006).** Building of the Tetraspanin Web: Distinct Structural Domains of CD81 Function in Different Cellular Compartments. *Molecular and Cellular Biology* **26**, 1373–1385.
- Shoukry, N. H., Grakoui, A., Houghton, M., Chien, D. Y., Ghayeb, J., Reimann, K. A. & Walker, C. M. (2003).** Memory CD8+ T Cells Are Required for Protection from Persistent Hepatitis C Virus Infection. *Journal of Experimental Medicine* **197**, 1645–1655.
- Si, Y., Liu, S., Liu, X., Jacobs, J. L., Cheng, M., Niu, Y., Jin, Q., Wang, T. & Yang, W. (2012).** A human claudin-1-derived peptide inhibits hepatitis C virus entry. *hepatology* **56**, 507–515.
- Silvie, O., Charrin, S., Billard, M., Franetich, J. F., Clark, K. L., van Gemert, G. J., Sauerwein, R., Dautry, F., Boucheix, C., & other authors. (2006a).** Cholesterol contributes to the organization of tetraspanin-enriched microdomains and to CD81-dependent infection by malaria sporozoites. *Journal of Cell Science* **119**, 1992–2002.
- Silvie, O., Franetich, J.-F., Boucheix, C., Rubinstein, E. & Mazier, D. (2007).** Alternative invasion pathways for plasmodium berghei sporozoites. *International Journal of Parasitology* **37**, 173–182.
- Silvie, O., Greco, C., Franetich, J.-F., Dubart-Kupperschmitt, A., Hannoun, L., van Gemert, G.-J., Sauerwein, R. W., Levy, S., Boucheix, C., & other authors. (2006b).** Expression of human CD81 differently affects host cell susceptibility to malaria sporozoites depending on the Plasmodium species. *Cell Microbiol* **8**, 1134–1146.
- Silvie, O., Rubinstein, E., Franetich, J.-F., Prenant, M., Belnoue, E., Rénia, L., Hannoun, L., Eling, W., Levy, S., & other authors. (2003).** Hepatocyte CD81 is required for Plasmodium falciparum and Plasmodium yoelii sporozoite infectivity. *Nature Medicine* **9**, 93–96.
- Simister, P., Schmitt, M., Geitmann, M., Wicht, O., Danielson, U. H., Klein, R., Bressanelli, S. & Lohmann, V. (2009).** Structural and Functional Analysis of Hepatitis C Virus Strain JFH1 Polymerase. *Journal of Virology* **83**, 11926–11939. American Society for Microbiology (ASM).
- Singethan, K. & Schneider-Schaulies, J. (2008).** Tetraspanins: Small transmembrane proteins with big impact on membrane microdomain structures. *Communicative & Integrative Biology* **1**, 11. Landes Bioscience.
- Song, H., Ren, F., Li, J., Shi, S., Yan, L., Gao, F., Li, K. & Zhuang, H. (2012).** A laboratory-adapted HCV JFH-1 strain is sensitive to neutralization and can gradually escape under the selection pressure of neutralizing human plasma. *Virus Research* **169**, 154–161.

- Song, Y., Friebe, P., Tzima, E., Jünemann, C., Bartenschlager, R. & Niepmann, M. (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. Am Soc Microbiol.
- Spillmann, D. (2001).** Heparan sulfate: Anchor for viral intruders? *Biochimie* **83**, 811–817.
- Spoden, G., Freitag, K., Husmann, M., Boller, K., Sapp, M., Lambert, C. & Florin, L. (2008).** Clathrin- and Caveolin-Independent Entry of Human Papillomavirus Type 16—Involvement of Tetraspanin-Enriched Microdomains (TEMs). *PLoS ONE* **3**, e3313. Public Library of Science.
- Stamataki, Z., Shannon-Lowe, C., Shaw, J., Mutimer, D., Rickinson, A. B., Gordon, J., Adams, D. H., Balfe, P. & McKeating, J. A. (2009).** Hepatitis C virus association with peripheral blood B lymphocytes potentiates viral infection of liver-derived hepatoma cells. *Blood* **113**, 585–593. American Society of Hematology.
- Stapleton, J. T., Fong, S., Muerhoff, A. S., Bukh, J. & Simmonds, P. (2011).** The GB viruses: a review and proposed classification of GBV-A, GBV-C (HGV), and GBV-D in genus Pegivirus within the family Flaviviridae. *Journal of General Virology* **92**, 233–246.
- Stein, B. S., Bensch, K. G. & Sussman, H. H. (1984).** Complete inhibition of transferrin recycling by monensin in K562 cells. *J Biol Chem* **259**, 14762–14772.
- Steinmann, E., Penin, F., Kallis, S., Patel, A. H., Bartenschlager, R. & Pietschmann, T. (2007).** Hepatitis C Virus p7 Protein Is Crucial for Assembly and Release of Infectious Virions. *PLoS Pathogens* **3**, e103.
- Steinmann, E. & Pietschmann, T. (2010).** Hepatitis C Virus P7—A Viroporin Crucial for Virus Assembly and an Emerging Target for Antiviral Therapy. *Viruses* **2**, 2078–2095. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI).
- Stephen L Chen, T. R. M. (2006).** The Natural History of Hepatitis C Virus (HCV) Infection. *International Journal of Medical Sciences* **3**, 47. Ivyspring International Publisher.
- Stipp, C. S., Kolesnikova, T. V. & Hemler, M. E. (2001a).** EWI-2 Is a Major CD9 and CD81 Partner and Member of a Novel Ig Protein Subfamily. *J Biol Chem* **276**, 40545–40554.
- Stipp, C. S., Kolesnikova, T. V. & Hemler, M. E. (2003a).** EWI-2 regulates alpha3-beta1 integrin-dependent cell functions on laminin-5. *The Journal of Cell Biology* **163**, 1167–1177.
- Stipp, C. S., Orlicky, D. & Hemler, M. E. (2001b).** FPRP, a major, highly stoichiometric, highly specific CD81- and CD9-associated protein. *J Biol Chem* **276**, 4853–4862.
- Stipp, C. S. C., Kolesnikova, T. V. T. & Hemler, M. E. M. (2003b).** Functional domains in tetraspanin proteins. *Trends Biochem Sci* **28**, 106–112.
- Su, A. I., Pezacki, J. P., Wodicka, L., Brideau, A. D., Supekova, L., Thimme, R., Wieland, S., Bukh, J., Purcell, R. H., & other authors. (2002).** Genomic analysis of the host response to hepatitis C virus infection. *hepatology* **99**, 15669–15674.
- Sumpter, R., Loo, Y.-M., Foy, E., Li, K., Yoneyama, M., Fujita, T., Lemon, S. M. & Michael, G. M. (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.
- Syder, A. J., Lee, H., Zeisel, M. B., Grove, J., Soulier, E., Macdonald, J., Chow, S., Chang, J., Baumert, T. F., & other authors. (2011).** Small molecule scavenger receptor BI antagonists are potent HCV entry inhibitors. *Journal of Hepatology* **54**, 48–55.

- Takaki, A., Wiese, M., Maertens, G., Depla, E., Seifert, U., Liebetrau, A., Miller, J. L., Manns, M. P. & Rehermann, B. (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.
- Tanaka, T., Kato, N., Cho, M. J., Sugiyama, K. & Shimotohno, K. (1996).** Structure of the 3' terminus of the hepatitis C virus genome. *Journal of Virology* **70**, 3307–3312.
- Tao, W., Xu, C., Ding, Q., Li, R., Xiang, Y., Chung, J. & Zhong, J. (2009).** A single point mutation in E2 enhances hepatitis C virus infectivity and alters lipoprotein association of viral particles. *Virology* **395**, 67–76.
- Targett-Adams, P., Boulant, S. & McLauchlan, J. (2008).** Visualization of Double-Stranded RNA in Cells Supporting Hepatitis C Virus RNA Replication. *Journal of Virology* **82**, 2182–2195.
- Tasaka, M., Sakamoto, N., Itakura, Y., Nakagawa, M., Itsui, Y., Sekine-Osajima, Y., Nishimura-Sakurai, Y., Chen, C. H., Yoneyama, M., & other authors. (2007).** Hepatitis C virus non-structural proteins responsible for suppression of the RIG-I/Cardif-induced interferon response. *Journal of General Virology* **88**, 3323–3333.
- Taylor, D. R., Shi, S. T., Romano, P. R., Barber, G. N. & Lai, M. M. M. (1999).** Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science* **285**, 107–110.
- Tellinghuisen, T. L., Foss, K. L., Treadaway, J. C. & Rice, C. M. (2008a).** 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.
- Tellinghuisen, T. L., Marcotrigiano, J., Gorbalenyal, A. E. & Rice, C. M. (2004).** The NS5A Protein of Hepatitis C Virus Is a Zinc Metalloprotein. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 48576–48587.
- Tellinghuisen, T. L., Foss, K. L. & Treadaway, J. (2008b).** Regulation of Hepatitis C Virion Production via Phosphorylation of the NS5A Protein. *PLoS Pathogens* **4**, e1000032 (A. Garcia-Sastre, Ed.).
- Tellinghuisen, T. L., Marcotrigiano, J. & Rice, C. M. (2005).** Structure of the zinc-binding domain of an essential component of the hepatitis C virus replicase. *Nature* **435**, 374–379.
- Tews, B. A., Popescu, C.-I. & Dubuisson, J. (2010).** Last Stop Before Exit – Hepatitis C Assembly and Release as Antiviral Drug Targets. *Viruses* **2**, 1782–1803. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI).
- Tham, T. N., Gouin, E., Rubinstein, E., Boucheix, C., Cossart, P. & Pizarro-Cerda, J. (2010).** Tetraspanin CD81 is required for *Listeria monocytogenes* invasion. *Infect Immun* **78**, 204–209.
- Thimme, R. (2001).** Determinants of Viral Clearance and Persistence during Acute Hepatitis C Virus Infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **194**, 1395–1406.
- Thompson, A. A., Zou, A., Yan, J., Duggal, R., Hao, W., Molina, D., Cronin, C. N. & Wells, P. A. (2009).** Biochemical characterization of recombinant hepatitis C virus nonstructural protein 4B: evidence for ATP/GTP hydrolysis and adenylate kinase activity. *Biochemistry* **48**, 906–916.
- Thorpe, L. E., Ouellet, L. J., Hershov, R., Bailey, S. L., Williams, I. T., Williamson, J., Monterroso, E. R. & Garfein, R. S. (2002).** Risk of hepatitis C virus infection among young adult injection drug users who share injection equipment. *Am J Epidemiol* **155**, 645–653.

- Timpe, J. M., Stamataki, Z., Jennings, A., Hu, K., Farquhar, M. J., Harris, H. J., Schwarz, A., Desombere, I., Roels, G. L., & other authors. (2008).** Hepatitis C virus cell-cell transmission in hepatoma cells in the presence of neutralizing antibodies. *hepatology* **47**, 17–24.
- Tinkle, C. & Haas-Kogan, D. (2012).** Hepatocellular carcinoma: natural history, current management, and emerging tools. *hepatology*. **6**, 207–219.
- Tong, Y., Zhu, Y., Xia, X., Liu, Y., Feng, Y., Hua, X., Chen, Z., Ding, H., Gao, L., & other authors. (2011).** Tupaia CD81, SR-BI, Claudin-1, and Occludin Support Hepatitis C Virus Infection. *Journal of Virology* **85**, 2793–2802.
- Toyo-oka, K., Yashiro-Ohtani, Y., Park, C. S., Tai, X. G., Miyake, K., Hamaoka, T. & Fujiwara, H. (1999).** Association of a tetraspanin CD9 with CD5 on the T cell surface: role of particular transmembrane domains in the association. *International Immunology* **11**, 2043–2052.
- Trauner, M., Meier, P. J. & Boyer, J. L. (1998).** Molecular Pathogenesis of Cholestasis. *The New England Journal of Medicine* **339**, 1217–1227.
- Tsai, S., Liaw, Y., Chen, M., Huang, C. & Kuo, G. C. (1997).** Detection of type 2-like T-helper cells in hepatitis C virus infection: Implications for hepatitis C virus chronicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **25**, 449–458.
- Tsai, Y. C., Mendoza, A., Mariano, J. M., Zhou, M., Kostova, Z., Chen, B., Veenstra, T., Hewitt, S. M., Helman, L. J., & other authors. (2007).** The ubiquitin ligase gp78 promotes sarcoma metastasis by targeting KAI1 for degradation. *Nature Medicine* **13**, 1504–1509.
- Tscherne, D. M., Evans, M. J., Hahn, von, T., Jones, C. T., Stamataki, Z., McKeating, J. A., Lindenbach, B. D. & Rice, C. M. (2007).** Superinfection Exclusion in Cells Infected with Hepatitis C Virus. *Journal of Virology* **81**, 3693–3703. American Society for Microbiology (ASM).
- Tscherne, D. M., Jones, C. T., Evans, M. J., Lindenbach, B. D., McKeating, J. A. & Rice, C. M. (2006).** Time- and Temperature-Dependent Activation of Hepatitis C Virus for Low-pH-Triggered Entry. *Journal of Virology* **80**, 1734–1741.
- Tseng, C. T. K. & Klimpel, G. R. (2002).** Binding of the Hepatitis C Virus Envelope Protein E2 to CD81 Inhibits Natural Killer Cell Functions. *Journal of Experimental Medicine* **195**, 43–50.
- Tsukita, S., Furuse, M. & Ito, M. (2001).** Multifunctional strands in tight junctions. *Nature Reviews Molecular Biologie* **2**, 285–293. Nature Publishing Group.
- Tsukiyama-Kohara, K., Iizuka, N., Kohara, M. & Nomoto, A. (1992).** Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *Journal of Virology* **66**, 1476. American Society for Microbiology (ASM).
- Tu, L., Sun, T. T. & Kreibich, G. (2002).** Specific Heterodimer Formation Is a Prerequisite for Uroplakins to Exit from the Endoplasmic Reticulum. *Mol Biol Cell* **13**, 4221. American Society for Cell Biology.
- Tycko, B., Keith, C. H. & Maxfield, F. R. (1983).** Rapid acidification of endocytic vesicles containing asialoglycoprotein in cells of a human hepatoma line. *The Journal of Cell Biology* **97**, 1762. The Rockefeller University Press.
- Uhlir, C. M. & Whitehead, A. S. (1999).** Serum amyloid A, the major vertebrate acute-phase reactant. *Trends in Cell Biology* **265**, 501–523.
- Uprichard, S. L., Chung, J., Chisari, F. V. & Wakita, T. (2006).** Replication of a hepatitis C virus replicon clone in mouse cells. *Virol J* **3**, 89. BioMed Central.

- Urbani, S., Amadei, B., Fisicaro, P., Tola, D., Orlandini, A., Sacchelli, L., Mori, C., Missale, G. & Ferrari, C. (2006). Outcome of acute hepatitis C is related to virus-specific CD4 function and maturation of antiviral memory CD8 responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **44**, 126–139.
- van Niel, G., Porto-Carreiro, I. & Raposo, G. (2006). Exosomes: A Common Pathway for a Specialized Function. *The Journal of Biochemistry* **140**, 13–21.
- van Spriël, A. B. (2011). Tetraspanins in the humoral immune response. *Biochem Soc Trans* **39**, 512–517.
- VanCompernelle, S. E., Wiznycia, A. V., Rush, J. R., Dhanasekaran, M., Baures, P. W. & Todd, S. C. (2003). Small molecule inhibition of hepatitis C virus E2 binding to CD81. *Virology* **314**, 371–380.
- Vanwolleghem, T., Libbrecht, L., Hansen, B. E., Desombere, I., Roskams, T., Meuleman, P. & Leroux-Roels, G. (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.
- Varshney, J., Sharma, P. K. & Sharma, A. (2012). A review on an update of NS5B polymerase hepatitis C virus inhibitors. *European R.* **16**, 677-671.
- Vassilaki, N., Friebe, P., Meuleman, P., Kallis, S., Kaul, A., Paranhos-Baccala, G., Leroux-Roels, G., Mavromara, P. & Bartenschlager, R. (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.
- Verdegem, D., Badillo, A., Wieruszkeski, J. M., Landrieu, I., Leroy, A., Bartenschlager, R., Penin, F., Lippens, G. & Hanouille, X. (2011). Domain 3 of the NS5A protein from the hepatitis C virus has an intrinsic  $\alpha$ -helical propensity and is a substrate of cyclophilin A. *J Biol Chem.* **286** (23), 20441-20454.
- Vidal-Laliena, M., Romero, X., March, S., Requena, V., Petriz, J. & Engel, P. (2005). Characterization of antibodies submitted to the B cell section of the 8th Human Leukocyte Differentiation Antigens Workshop by flow cytometry and immunohistochemistry. *Cell Immunol* **236**, 6–16.
- Vieyres, G., Thomas, X., Descamps, V., Duverlie, G., Patel, A. H. & Dubuisson, J. (2010). Characterization of the envelope glycoproteins associated with infectious hepatitis C virus. *Journal of Virology* **84**, 10159–10168.
- Voisset, C., Callens, N., Blanchard, E., Op de Beeck, A., Dubuisson, J. & Vu-Dac, N. (2005). High Density Lipoproteins Facilitate Hepatitis C Virus Entry through the Scavenger Receptor Class B Type I. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 7793–7799.
- Voisset, C., Op de Beeck, A., Horellou, P., Dreux, M., Gustot, T., Duvet, S., Cosset, F. L., Vu-Dac, N. & Dubuisson, J. (2006). High-density lipoproteins reduce the neutralizing effect of hepatitis C virus (HCV)-infected patient antibodies by promoting HCV entry. *Journal of General Virology* **87**, 2577–2581.
- Voisset, C., Lavie, M., Helle, F., de Beeck, A. O., Bilheu, A., Bertrand-Michel, J., Tercé, F., Cocquerel, L., Wychowski, C., & other authors. (2008). Ceramide enrichment of the plasma membrane induces CD81 internalization and inhibits hepatitis C virus entry. *Cell Microbiol* **10**, 606–617.
- Wakita, T., Pietschmann, T., Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., Murthy, K., Habermann, A., Kräusslich, H.-G., & other authors. (2005). Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nature Medicine* **11**, 791–796.

- Wang, C., Sarnow, P. & Siddiqui, A. (1993).** Translation of human hepatitis C virus RNA in cultured cells is mediated by an internal ribosome-binding mechanism. *Journal of Virology* **67**, 3338. American Society for Microbiology (ASM).
- Wang, N., Liang, Y., Devaraj, S., Wang, J., Lemon, S. M. & Li, K. (2009).** Toll-Like Receptor 3 Mediates Establishment of an Antiviral State against Hepatitis C Virus in Hepatoma Cells. *Journal of Virology* **83**, 9824–9834.
- Ward, S., Lauer, G., Isba, R., Walker, B. & Klenerman, P. (2002).** Cellular immune responses against hepatitis C virus: the evidence base 2002. *Clin Exp Immunol* **128**, 195–203.
- Washburn, M. L. M., Bility, M. T. M., Zhang, L. L., Kovalev, G. I. G., Buntzman, A. A., Frelinger, J. A. J., Barry, W. W., Ploss, A. A., Rice, C. M. C. & Su, L. L. (2011).** A humanized mouse model to study hepatitis C virus infection, immune response, and liver disease. *YGASt* **140**, 1334–1344.
- Watashi, K., Ishii, N., Hijikata, M., Inoue, D., Murata, T., Miyanari, Y. & Shimotohno, K. (2005).** Cyclophilin B Is a Functional Regulator of Hepatitis C Virus RNA Polymerase. *Trends in Cell Biology* **19**, 111–122.
- Waxman, L., Whitney, M., Pollok, B. A., Kuo, L. C. & Darke, P. L. (2001).** Host cell factor requirement for hepatitis C virus enzyme maturation. *PNAS* **98**, 13931–13935.
- Welbourn, S., Green, R., Gamache, I., Dandache, S., Lohmann, V., Bartenschlager, R., Meerovitch, K. & Pause, A. (2005).** Hepatitis C Virus NS2/3 Processing Is Required for NS3 Stability and Viral RNA Replication. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 29604–29611.
- Weng, J., Kremontsov, D. N., Khurana, S., Roy, N. H. & Thali, M. (2009).** Formation of Syncytia Is Repressed by Tetraspanins in Human Immunodeficiency Virus Type 1-Producing Cells. *Journal of Virology* **83**, 7467–7474.
- Whittaker, J., Hammond, V. A., Taylor, R. & Albertini, K. G. M. M. (1986).** Effects of monensin on insulin interactions with isolated hepatocytes. Evidence for inhibition of receptor recycling and insulin degradation. *Biochem J* **234**, 463. Portland Press Ltd.
- Wiegand, J., Buggisch, P., Boecher, W., Zeuzem, S., Gelbmann, C. M., Berg, T., Kauffmann, W., Kallinowski, B., Cornberg, M., & other authors. (2006).** Early monotherapy with pegylated interferon alpha-2b for acute hepatitis C infection: The HEP-NET acute-HCV-II study. *hepatology* **43**, 250–256.
- Wilson, G. K., Brimacombe, C. L., Rowe, I. A., Reynolds, G. M., Fletcher, N. F., Stamataki, Z., Bhogal, R. H., Simões, M. L., Ashcroft, M., & other authors. (2012).** A dual role for hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  in the hepatitis C virus lifecycle and hepatoma migration. *Journal of Hepatology* **56**, 803–809. Elsevier.
- Winterwood, N. E., Varzavand, A., Meland, M. N., Ashman, L. K. & Stipp, C. S. (2006).** A Critical Role for Tetraspanin CD151 in  $\beta$ 1 and  $\beta$ 4 Integrin-dependent Tumor Cell Functions on Laminin-5. *Mol Biol Cell* **17**, 2707–2721.
- Witteveldt, J., Evans, M. J., Bitzegeio, J., Koutsoudakis, G., Owsianka, A., Angus, A. G. N., Keck, Z. Y., Fong, S. K. H., & other authors. (2009).** CD81 is dispensable for hepatitis C virus cell-to-cell transmission in hepatoma cells. *Journal of General Virology* **90**, 48. Society for General Microbiology.

- Wölk, B., Sansonno, D., Kräusslich, H. G., Dammacco, F., Rice, C. M., Blum, H. E. & Moradpour, D. (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. American Society for Microbiology (ASM).
- Wright, M., Rochelle, J. M., Tomlinson, M. G., Seldin, M. F. & Williams, A. F. (1993).** Gene structure, chromosomal localization, and protein sequence of mouse CD53 (Cd53): evidence that the transmembrane 4 superfamily arose by gene duplication. *International Immunology*. **5**, 209-216.
- Xu, Z., Choi, J., Yen, T., Lu, W., Strohecker, A., Govindarajan, S., Chien, D., Selby, M. J. & Ou, J.-H. (2001).** Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift. *EMBO J* **20**, 3840–3848. Nature Publishing Group.
- Yagnik, A. T., Lahm, A., Meola, A., Roccasecca, R. M., Ercole, B. B., Nicosia, A. & Tramontano, A. (2000).** A model for the hepatitis C virus envelope glycoprotein E2. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **40**, 355–366. Wiley Online Library.
- Yalaoui, S., Huby, T., Franetich, J.-F., Gego, A., Rametti, A., Moreau, M., Collet, X., Siau, A., van Gemert, G.-J., & other authors. (2008a).** Scavenger Receptor BI Boosts Hepatocyte Permissiveness to Plasmodium Infection. *Cell Host & Microbe* **4**, 283–292.
- Yalaoui, S., Zougbedé, S., Charrin, S., Silvie, O., Arduise, C., Farhati, K., Boucheix, C., Mazier, D., Rubinstein, E. & Froissard, P. (2008b).** Hepatocyte Permissiveness to Plasmodium Infection Is Conveyed by a Short and Structurally Conserved Region of the CD81 Large Extracellular Domain. *PLoS Pathogens* **4**, e1000010 (M. M. Mota, Ed.).
- Yamada, M., Tamura, Y., Sanzen, N., Sato-Nishiuchi, R., Hasegawa, H., Ashman, L. K., Rubinstein, E., Yañez-Mó, M., Sánchez-Madrid, F. & Sekiguchi, K. (2008).** Probing the interaction of tetraspanin CD151 with integrin  $\alpha 3\beta 1$  using a panel of monoclonal antibodies with distinct reactivities toward the CD151–integrin  $\alpha 3\beta 1$  complex. *Biochem J* **415**, 417. Portland Press Ltd.
- Yanagi, M., Purcell, R. H., Emerson, S. U. & Bukh, J. (1997).** Transcripts from a single full-length cDNA clone of hepatitis C virus are infectious when directly transfected into the liver of a chimpanzee. *Proc Nat Acad Sct USA* **94**, 8738. National Academy of Sciences.
- Yanagishita, M. & Hascall, V. C. (1985).** Effects of monensin on the synthesis, transport, and intracellular degradation of proteoglycans in rat ovarian granulosa cells in culture. *J Biol Chem* **260**, 5445–5455.
- Yang, W., Qiu, C., Biswas, N., Jin, J., Watkins, S. C., Montelaro, R. C., Coyne, C. B. & Wang, T. (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.
- Yang, X. H., Kovalenko, O. V., Kolesnikova, T. V., Andzelm, M. M., Rubinstein, E., Strominger, J. L. & Hemler, M. E. (2006).** Contrasting Effects of EWI Proteins, Integrins, and Protein Palmitoylation on Cell Surface CD9 Organization. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 12976–12985.
- Yang, X., Kovalenko, O. V., Tang, W., Claas, C., Stipp, C. S. & Hemler, M. E. (2004).** Palmitoylation supports assembly and function of integrin-tetraspanin complexes. *The Journal of Cell Biology* **167**, 1231–1240.

- Yang, X., Claas, C. & Kraeft, S.-K. (2002).** Palmitoylation of tetraspanin proteins: modulation of CD151 lateral interactions, subcellular distribution, and integrin-dependent cell morphology. *Mol Biol Cell* **13**, 767–781.
- Yi, M. K. & Lemon, S. M. (2003).** 3' nontranslated RNA signals required for replication of hepatitis C virus RNA. *Journal of Virology* **77**, 3557–3568. Am Soc Microbiol.
- Yi, M., Ma, Y., Yates, J. & Lemon, S. M. (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. American Society for Microbiology (ASM).
- Yi, M., Ma, Y., Yates, J. & Lemon, S. M. (2009).** trans-Complementation of an NS2 Defect in a Late Step in Hepatitis C Virus (HCV) Particle Assembly and Maturation. *PLoS Pathogens* **5**, e1000403. Public Library of Science.
- Yi, M. & Lemon, S. M. (2009).** Genotype 1a HCV (H77S) infection system. *Methods Mol Biol* **510**, 337–346.
- Yi, M., Villanueva, R. A., Thomas, D. L., Wakita, T. & Lemon, S. M. (2006).** Production of infectious genotype 1a hepatitis C virus (Hutchinson strain) in cultured human hepatoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 2310–2315.
- Yoon, J. C., Shiina, M., Ahlenstiel, G. & Rehmann, B. (2009).** Natural killer cell function is intact after direct exposure to infectious hepatitis C virions. *hepatology* **49**, 12–21.
- Yu, G. Y., Lee, K. J., Gao, L. & Lai, M. M. C. (2006).** Palmitoylation and Polymerization of Hepatitis C Virus NS4B Protein. *Journal of Virology* **80**, 6013–6023.
- Yukse, K., Chen, W.-L., Chien, D. & Ou, J.-H. J. (2009).** Ubiquitin-independent degradation of hepatitis C virus F protein. *Journal of Virology* **83**, 612–621.
- Zahid, M. N., Turek, M., Xiao, F., Thi, V. L. D., Guérin, M., Fofana, I., Bachellier, P., Thompson, J., Delang, L., & other authors. (2012).** The post-binding activity of scavenger receptor BI mediates initiation of hepatitis C virus infection and viral dissemination. *hepatology*. doi: 10.1002/hep.26097.
- Zein, N. N. (2000).** Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *Clin Microbiol Rev* **13**, 223–235.
- Zeisel, M. B., Koutsoudakis, G., Schnober, E. K., Haberstroh, A., Blum, H. E., Cosset, F. O.-L. C., Wakita, T., Jaeck, D., Doffoël, M., & other authors. (2007).** Scavenger receptor class B type I is a key host factor for hepatitis C virus infection required for an entry step closely linked to CD81. *hepatology* **46**, 1722–1731.
- Zeuzem, S., Yoshida, E. M., Benhamou, Y., Pianko, S., Bain, V. G., Shouval, D., Flisiak, R., Rehak, V., Grigorescu, M., & other authors. (2008).** Albinterferon alfa-2b dosed every two or four weeks in interferon-naïve patients with genotype 1 chronic hepatitis C. *Nature Cell Biology* **48**, 407–417.
- Zhang, J., Randall, G., Higginbottom, A., Monk, P., Rice, C. M. & McKeating, J. A. (2004).** CD81 Is Required for Hepatitis C Virus Glycoprotein-Mediated Viral Infection. *Journal of Virology* **78**, 1448–1455.
- Zhang, P., Wu, C. G., Mihalik, K., Virata-Theimer, M. L., Yu, M.-Y. W., Alter, H. J. & Feinstone, S. M. (2007).** Hepatitis C virus epitope-specific neutralizing antibodies in Igs prepared from human plasma. *Proc Nat Acad Sct USA*. **104**, 8449–8454
- Zhang, X. A., Lane, W. S., Charrin, S., Rubinstein, E. & Liu, L. (2003).** EW12/PGRL associates with the metastasis suppressor KAI1/CD82 and inhibits the migration of prostate cancer cells. *Cancer Res* **63**, 2665–2674.
- Zhang, Y. Y., Zhang, B. H., Ishii, K. & Liang, T. J. (2010).** Novel Function of CD81 in Controlling Hepatitis C Virus Replication. *Journal of Virology* **84**, 3396–3407.

- Zhang, Y., Li, X., Becker, K. A. & Gulbins, E. (2009).** Ceramide-enriched membrane domains—Structure and function. *BBA - Biomembranes* **1788**, 178–183. Elsevier B.V.
- Zhao, W., Liao, G.-Y., Jiang, Y.-J. & Jiang, S.-D. (2003).** No requirement of HCV 5'NCR for HCV-like particles assembly in insect cells. *WJG* **9**, 2226–2231.
- Zheng, A., Yuan, F., Li, Y., Zhu, F., Hou, P., Li, J., Song, X., Ding, M. & Deng, H. (2007).** Claudin-6 and Claudin-9 Function as Additional Coreceptors for Hepatitis C Virus. *Journal of Virology* **81**, 12465–12471.
- Zhong, J., Gastaminza, P., Cheng, G., kapadia, S., kato, T., Burton, D. R., Wieland, S., Uprichard, S. L., Wakita, T. & Chisari, F. V. (2005).** Robust hepatitis C virus infection in vitro. *PNAS* **102**, 9294–9299.
- Zhu, G.-Z., Miller, B. J., Boucheix, C., Rubinstein, E., Liu, C. C., Hynes, R. O., Myles, D. G. & Primakoff, P. (2002).** Residues SFQ (173-175) in the large extracellular loop of CD9 are required for gamete fusion. *Development*. **129**, 1995-2002
- Zhu, Q., Guo, J. T. & Seeger, C. (2003).** Replication of Hepatitis C Virus Subgenomes in Nonhepatic Epithelial and Mouse Hepatoma Cells. *Journal of Virology* **77**, 9204–9210. American Society for Microbiology (ASM).
- Zhu, Y.-Z., Luo, Y., Cao, M.-M., Liu, Y., Liu, X.-Q., Wang, W., Wu, D.-G., Guan, M., Xu, Q.-Q., & other authors. (2012).** Significance of palmitoylation of CD81 on its association with tetraspanin-enriched microdomains and mediating hepatitis C virus cell entry. *Virology* **429**, 112–123.
- Ziyyat, A., Rubinstein, E., Monier-Gavelle, F., Barraud, V., Kulski, O., Prenant, M., Boucheix, C., Bomsel, M. & Wolf, J. P. (2006).** CD9 controls the formation of clusters that contain tetraspanins and the integrin alpha6-beta1, which are involved in human and mouse gamete fusion. *Journal of Cell Science* **17**, 254–263.
- Zöller, M. M. (2009).** Tetraspanins: push and pull in suppressing and promoting metastasis. *Nat Rev Cancer* **9**, 40–55.

## **6) ANNEXES**

Annexe n°1 :

The association of CD81 with tetraspanin-enriched microdomains is not essential for Hepatitis C virus entry

**Rocha-Perugini, V., Lavie, M., Delgrange, D., Canton, J., Pillez, A., Potel, J., Lecoecur, C., Rubinstein, E., Dubuisson, J., & other authors. (2009).** The association of CD81 with tetraspanin-enriched microdomains is not essential for Hepatitis C virus entry. *BMC Microbiol* **9**, 111.

Annexe n°2 :

Interacting Regions of CD81  
and Two of Its Partners, EWI-2  
and EWI-2wint, and Their  
Effect on Hepatitis C Virus  
Infection

**Montpellier, C., Tews, B. A., Poitrimole, J., Rocha-Perugini, V., D'Arienzo, V., Potel, J., Zhang, X. A., Rubinstein, E., Dubuisson, J. & Cocquerel, L. (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.