



Doctorat Université Libanaise et Université Lille 2

THESE EN COTUTELLE

Pour obtenir le grade de Docteur délivré par

L'Université Lille 2 Droit et Santé

Spécialité: Microbiologie, Immunologie, Virologie et Parasitologie

et

L'Ecole Doctorale des Sciences et Technologie

(Université Libanaise)

Spécialité: Microbiologie alimentaire et médicale

Présentée et soutenue publiquement par

Juliano HADDAD

Le 26 septembre 2017

**Etude biochimique et fonctionnelle de la glycoprotéine E1 du Virus de
l'Hépatite C (HCV)**

Directeur de thèse Français: **Dr. Jean DUBUISSON**

Directeur de thèse Libanais: **Dr. Fouad DABBOUSSI**

Membres du Jury

Dr. Cécile Voisset

Rapporteur

Dr. Richard Maroun

Rapporteur

Dr. Didier Hober

Examineur

Dr. Mira Chaar

Examineur

*A mes parents,
A mes nièces et neveux Emeline, Isabelle, Georges et Christian*

*“If want to succeed,
you must work to overcome the obstacles on your path.”*

— Lailah Gifty Akita

Remerciements

Comme le veut la tradition, je vais tenter de satisfaire au difficile exercice de la page des remerciements, peut-être la tâche la plus ardue de ces années de thèse. Non qu'exprimer ma gratitude envers les personnes en qui j'ai trouvé un soutien soit contre ma nature, bien au contraire. La difficulté tient plutôt dans le fait de n'oublier personne.

En premier lieu, je tiens à remercier vivement les membres du jury qui ont accepté d'évaluer mon travail en tant que président, rapporteurs et examinateurs.

Je tiens à exprimer ma gratitude au directeur de l'équipe MCV et mon directeur de thèse, Dr. Jean DUBUISSON, je ne suis pas sûr que quelques lignes soient suffisantes pour te démontrer toute mon admiration! Un immense merci et une profonde reconnaissance pour tout ce que tu m'as apporté. Trois ans de vrai travail d'équipe et de bonne ambiance que je n'oublierai jamais. C'était un vrai plaisir de travailler avec toi. Tu m'as apporté plein de connaissances scientifiques à chaque fois j'ai parlé avec toi. Merci pour m'avoir encadré et pour être un chef idéal non seulement sur le plan professionnel mais aussi sur le plan humain. Merci pour m'avoir donné l'opportunité d'être un membre de l'équipe DUBUISSON !!

Je tiens aussi à remercier le directeur du Laboratoire Microbiologie Santé et Environnement (LMSE) à l'Université Libanaise Dr. Monzer HAMZE, pour m'avoir donné l'opportunité de travailler sur ce projet, vraiment vous étiez toujours à mes côtés pas seulement comme directeur de laboratoire mais aussi le père qui me donne les conseils scientifiques et humains.

Un grand merci pour mon directeur de thèse Dr. Fouad DABBOUSSI, pour la confiance que vous m'avez attribuée pendant ma thèse, pour le soutien scientifique professionnel. Je tiens également à lui exprimer mes gratitude.

Je suis également redevable à Dr. Muriel LAVIE, qui s'est toujours soucié de m'offrir, de tout point de vue, les meilleures conditions de travail possibles. Je la remercie en particulier pour sa grande disponibilité, ses grandes qualités scientifiques et la confiance qu'elle m'a accordée. Mes remerciements s'adressent aussi à Dr. Yves Rouillé, pour ses conseils surtout en biologie cellulaire qui ont facilité une partie de mes travaux.

Un grand merci à Dr. Sandrine Belouzard, qui m'a appris beaucoup de techniques et m'a aidé à bien maîtriser les manipulations au P3 grâce à la bonne formation qu'elle m'a fournie.

Je remercie également l'association « Lebanese Development Association » pour le financement accordé durant ces trois années à travers la bourse attribuée de la part de la famille « MOKADDEM ».

Merci à Rayan, qui a partagé mon stress, mes moments difficiles ainsi que mes moments de joie. Je le remercie pour ses conseils, pour son soutien « choukran ».

Laurence et Claire, merci pour vos critères scientifiques qui m'ont beaucoup aidé.

Sophana, merci pour m'avoir aidé dans la préparation des figures du papier et pour les moments inoubliables qu'on a passé ensemble.

Merci à Rehab, pour les petits cadeaux égyptiens et pour les bons moments qu'on a partagé ensemble.

Merci à Maliki « le king », tu as créé une belle ambiance dans le labo. Merci pour tout.

Merci à Najet, pour les bons moments qu'on a passé ensemble.

J'aimerais remercier toutes les personnes de l'équipe MCV avec lesquelles j'ai pu interagir durant ma thèse, cela a été un réel plaisir de vous connaître tous, Czeslaw, Adeline, Laura, Anne, Cécile-Marie, Nathalie, Karin, Ariane, Anabelle, Marie-Emmanuelle, Juliette, Laure, Pritom, Kévin, Lydia, Karoline et Valentin. Merci pour votre gentillesse.

Mes remerciements s'adressent aussi à Mr. Nazih MOKADDEM, pour son support et ses encouragements tout le long de mon parcours.

Enfin, j'adresse toute mon affection à ma famille, et en particulier mes parents, qui c'est à eux que je dédie cette thèse. Vous étiez toujours mes idoles, mes meilleurs amis et surtout je reconnais que sans vous j'aurais jamais été là aujourd'hui. Tous mes mots ne pourront pas exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez fait pour moi pendant toute ma vie. Je vous aime infiniment.

Cadre de travail

- Laboratoire

Le travail a été effectué au sein de l'Institut Pasteur de Lille - Centre d'infection et d'immunité de Lille - dirigé par le Dr. Camille Locht. Plus précisément, mon travail a été réalisé dans l'équipe 5 : « Virologie Moléculaire et Cellulaire » animée par le Dr. Jean Dubuisson. Ce travail a été réalisé dans le cadre d'une collaboration entre l'Université Libanaise (Ecole doctorale de Sciences et biotechnologies) et l'Université Lille 2 Droit et Santé.

- Financement

Ce projet a été financé par une bourse doctorale de l'Association « Lebanese Development association » en collaboration avec l'Université Libanaise. Une partie de mon travail a également été financée par l'Université Lille 2 et par l'Agence Nationale de Recherche sur le Sida et les hépatites virales (ANRS).

Table des matières

<i>Listes des figures</i>	12
<i>Liste des tableaux</i>	13
<i>Liste des Abréviations</i>	14
<i>Résumé</i>	20
<i>Abstract</i>	22
<i>Introduction</i>	24
I. L'hépatite C	25
I.1. Le foie et les hépatites virales	25
I.1.a. Les hépatites virales	25
I.1.b. Le foie: organisation et fonctions	25
I.2. L'Hépatite C	27
I.2.a. Identification et épidémiologie de l'hépatite C	27
I.2.a.i. Identification de l'hépatite C	27
I.2.a.ii. Epidémiologie du HCV	28
I.2.b. Modes de transmission	29
I.2.c. Pathologie de la maladie	29
I.2.c.i. Hépatite aiguë	29
I.2.c.ii. Hépatite chronique	31
I.2.d. Réponse immunitaire contre le HCV	32
I.2.d.i. Réponse immunitaire innée	32
I.2.d.ii. Stratégie d'échappement à la réponse immunitaire innée	34
I.2.d.iii. Réponse immunitaire adaptative	34
I.2.e. Diagnostic de la maladie	37
I.2.e.i. Tests indirects	37
I.2.e.ii. Tests directs	37
I.2.e.iii. Le géotypage	38
I.2.e.iv. Le sous-typage	39
I.2.f. Traitements	39
I.2.f.i. Evolution des traitements	39
I.2.f.ii. Développement d'un vaccin?	43
II. Le Virus de l'Hépatite C	46
II.1. Classification et Distribution géographique	46
II.2. La particule virale	48
II.3. Le génome viral	49

II.4. Les protéines virales.....	51
II.4.a. Les protéines structurales.....	51
II.4.a.i. La protéine core	51
II.4.a.ii. La protéine ARFP	52
II.4.a.iii. Les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2	53
II.4.b. Les protéines non structurales.....	53
II.4.b.i. La protéine p7	53
II.4.b.ii. La protéine NS2	54
II.4.b.iii. Les protéines NS3 et NS4A	55
II.4.b.iv. La protéine NS4B.....	56
II.4.b.v. La protéine NS5A.....	57
II.4.b.vi. La protéine NS5B.....	58
III. Modèles et systèmes pour l'étude du HCV.....	60
III.1. Les systèmes de culture <i>in vitro</i>	60
III.1.a. Les systèmes réplicons du HCV	60
III.1.b. le système HCVpp	62
III.1.c. Le système de culture cellulaire HCVcc	64
III.1.d. les hépatocytes primaires humains	66
III.2. Modèles animaux	67
III.2.a. Chimpanzés	67
III.2.b. Les toupayes.....	68
III.2.c. Les rongeurs	69
III.2.a.i. Les souris génétiquement humanisées avec les récepteurs d'entrée... 69	
III.2.a.ii. Les souris chimériques xénotransplantées.....	70
III.2.a.iii. Les souris xénotransplantées immunocompétentes	72
IV. le cycle viral du HCV.....	73
IV.1. l'entrée virale.....	73
IV.1.a. Les facteurs d'attachement	73
IV.1.a.i. Les Lectines : DC-SIGN et L-SIGN	73
IV.1.a.ii. Les Glycosaminoglycanes (GAGs)	73
IV.1.a.iii. Les récepteurs aux LDL (LDLr)	74
IV.1.b. Les récepteurs	75
IV.1.b.i. La tétraspanine CD81	75
IV.1.b.ii. SR-BI	76
IV.1.b.iii. CLDN1.....	77
IV.1.b.iv. OCLN.....	78
IV.1.b.v. Autres facteurs d'entrée : NPC1L1, EGFR, Tfr1	79

IV.1.c. Mécanisme d'entrée et d'internalisation du HCV	81
IV.1.d. La Fusion	83
IV.2. La traduction du génome viral	86
IV.3. La réplication virale.....	86
IV.4. L'assemblage et la sécrétion des particules virales	90
IV.5. Transmission cellule - cellule	92
V. Les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2	94
V.1. Biogenèse de E1 et E2.....	94
V.1.a. Synthèse, et déterminants de l'hétérodimère E1E2	94
V.1.b. Repliement, glycosylation et formation des ponts disulfures	95
V.1.b.i. La glycosylation.....	95
V.1.b.ii. La formation des ponts disulfures	96
V.2. Organisation globale et structure	97
V.3. Les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 et la neutralisation virale	100
V.3.a. Les épitopes neutralisants de E2	101
V.3.b. Les épitopes neutralisants de E1	102
V.4. Fonctions de E1 et E2.....	103
V.4.a. Assemblage.....	103
V.4.b. Interactions avec les récepteurs	104
V.4.c. Fusion : une nouvelle classe de protéine de fusion chez le HCV ?	106
V.4.c.i. Le processus de fusion.....	106
V.4.c.ii. Les inducteurs du processus de fusion	108
V.4.c.iii. Les différentes classes des protéines de fusion virales	108
V.4.c.iv. Spécificité de la fusion du HCV.....	111
V.4.c.v. Caractérisation de la structure de E1 et E2 et implication dans le processus de fusion	112
<i>Contexte et Objectifs</i>	115
<i>Résultats</i>	119
<i>Partie I</i>	120
<i>Étude fonctionnelle de la région N-terminale de la glycoprotéine E1 du HCV</i>	120
<i>Partie II</i>	126
<i>Etude fonctionnelle des résidus conservés du peptide de fusion potentiel de E1</i>	126
<i>Discussion et conclusion</i>	143
<i>Méthodologie</i>	152
<i>Annexe</i>	157
<i>Bibliographie</i>	203

Listes des figures

Figure 1. Représentation des différentes fonctions du foie.....	27
Figure 2. Prévalence des anticorps anti-HCV dans le monde entier.....	28
Figure 3. Les marqueurs du laboratoire durant une infection aiguë du HCV.....	30
Figure 4. Représentation de l'évolution de l'infection par le HCV durant l'hépatite chronique..	32
Figure 5. Evolution des traitements depuis l'identification du virus HCV.....	42
Figure 6. Arbre phylogénétique des membres de la famille des <i>Flaviviridae</i>	47
Figure 7. Représentation de la distribution la plus communément observée des génotypes 1-6 du HCV.....	47
Figure 8. La particule virale du HCV.....	49
Figure 9. Représentation schématique du génome et de la polyprotéine du HCV.....	50
Figure 10. Représentation schématique de la protéine core du HCV.....	52
Figure 11. Représentation schématique de la protéine ARFP du HCV.....	52
Figure 12. La protéine p7.....	54
Figure 13. Représentation schématique de la protéase NS2/NS3 au niveau du RE.....	55
Figure 14. Structure cristallographique de la protéase/hélicase NS3/4A.....	56
Figure 15. Représentation schématique des domaines transmembranaires et intracellulaires de NS4B.....	57
Figure 16. Organisation et la position de la protéine NS5A dans le RE.....	58
Figure 17. Structure cristallographique de la protéine NS5B au niveau de la membrane du RE.....	59
Figure 18. Principe de la génération du système réplicon du HCV.....	62
Figure 19. Représentation schématique du système HCVpp.....	64
Figure 20. Principe de génération du système de culture HCVcc.....	66
Figure 21. Production des clones d'ADNc du HCV infectieux.....	68
Figure 22. Principe de génération de souris humanisées pour les récepteurs du HCV.....	70
Figure 23. Principe de génération des souris chimériques xénotransplantées.....	71
Figure 24. Principe de génération des souris xénotransplantées immunocompétentes.....	72
Figure 25. Représentation schématique du récepteur CD81.....	76
Figure 26. Représentation schématique du récepteur SR-BI.....	77
Figure 27. Structure des jonctions serrées au niveau du foie des mammifères.....	79
Figure 28. Représentation schématique de la structure du récepteur NPC1L1.....	80
Figure 29. Représentation schématique de l'étape d'entrée du HCV.....	85
Figure 30. La traduction et la réplication du HCV.....	89
Figure 31. Représentation schématique des étapes de l'assemblage et de la sécrétion des particules virales du HCV.....	93
Figure 32. Les glycoprotéines E1 et E2.....	96
Figure 33. Structure cristallographique de la glycoprotéine E2 du HCV.....	99
Figure 34. La séquence et les caractéristiques structurales identifiées dans E1.....	100
Figure 35. Etape de fusion des deux membranes lipidiques endosomale et virale.....	107
Figure 36. Structure atomique des trois classes de protéines de fusion I, II et III dans leurs formes de pré- et post-fusion.....	110
Figure 37. Effet de la mutation D263A sur la trimérisation de E1.....	122
Figure 38. Effet de la mutation D263A sur l'interaction entre E1 et E2.....	123
Figure 39. Effet des mutations sur la reconnaissance des récepteurs SR-B1 et CD81.....	124
Figure 40. La séquence et les structures secondaires de E1.....	127
Figure 41. Les ARN génomiques transcrits.....	128
Figure 42. Effet des mutations sur la réplication génomique des mutants.....	129

Figure 43. Effet des mutations sur l'infectiosité du HCV.....	130
Figure 44. Détermination de la sécrétion de la protéine core.....	133
Figure 45. Effet de la mutation sur le repliement et l'hétérodimérisation de E1E2.....	134
Figure 46. Les tests de Nneutralisation et d'inhibition de l'infectiosité par AR5A et hCD81-LEL.....	136
Figure 47. Tests de neutralisation et d'inhibition des récepteurs.....	138
Figure 48. Quantification intra et extracellulaire de l'ARN viral après précipitation avec PEG.....	140
Figure 49. Effet de la mutation G311A sur la trimérisation de E1.....	141
Figure 50. La génération des fragments d'ADN mutés.....	153
Figure 51. Le résultat de la PCR sur colonies.....	154

Liste des tableaux

Tableau 1. Caractéristiques des DAAs de la deuxième génération.....	42
Tableau 2. Essais cliniques pour le développement d'un vaccin contre le HCV.....	45
Tableau 3. Comparaison entre les différentes classes des protéines de fusion.....	112

Liste des Abréviations

A

a.a : acide aminé

ACSL3 : Acyl-CoA Synthetase Long-chain 3

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ADNc : Acide Désoxyribonucléique complémentaire

ALT : Alanine Aminotransferase

Apo : Apolipoprotéines

Arf : ADP Ribosylation Factors

ARFGAP1 : ADP-Ribosylation Factor GTPase-Activating Protein 1

ARFP : Alternative Reading Frame Protein

ARN : Acide Ribonucléique

B

BVDV : Bovine Viral Diarrhea Virus

C

CARD : Caspase Recruitment Domain

CD81 : Cluster of differentiation 81

CDC : Center for Disease Control

CHC : Carcinome Hépatocellulaire

CLDN : Claudin

D

DAA : Direct acting antiviral

DC-SIGN : Dendritic Cell-Specific ICAM-Grabbing Non-integrin

DGAT1 : Diacylglycérol Acyltransférase-1

E

E1 : Glycoprotéine d'Enveloppe E1

E2 : Glycoprotéine d'Enveloppe E2

ECL1 : Extracellular Loop 1

EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor

EIA : enzyme immunoassays

eIF : Eukaryotic Initiation Factors

ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

EP : Eléctroporation

EphA2 : Ephrin type-A receptor 2

ESCRT : Endosomal-Sorting Complex Required for Transport

F

FRG : Fah(-/-) Rag-2(-/-) and interleukin 2 receptor common Gamma chain(-/-)

G

GAGs : Glycosaminoglycanes

GBF1 : Golgi-Specific Brefeldin A-resistance guanine nucleotide exchange Factor 1

GL : Gouttelette Lipidique

GNA : *Galanthus nivalis*

GTP : Guanosine Triphosphate

H

HAV : Hepatitis A Virus

HBV : Hepatitis B Virus

HCV : Hepatitis C Virus

HCVcc : Hepatitis C Virus cell culture

HCVpp : Hepatitis C Virus pseudoparticles

hEF : human Entry Factor

HIV : Human Immunodeficiency Virus

HS : Heparan sulfate

HSC : Hematopoietic stem cell

HVR : Hypervariable Region

I

IFITM1 : Interferon Induced Transmembrane Protein 1

IFN : Interféron

Ig: Immunoglobuline

IgVR : intergenotypic variable region

IKK- α : I κ B kinase- α

IP : Immunoprécipitation

IRES : Internal Ribosomal Entry Site

IRF : Interferon Regulatory Factor

ISGs : Interferon Stimulated Genes

J

JAK-STAT : Janus Kinases- Signal Transducers and Activators of Transcription

L

L-SIGN : Liver-Specific ICAM-Grabbing Non-integrin

LDL : Low-Density Lipoproteins

LDLr : Low-Density Lipoproteins receptor

LEL : Large Extracellular Loop

LPL : Lipoprotéine Lipase

LVP : lipoviroparticules

M

MAVS : Mitochondrial Antiviral Signaling Protein

MLV : Murine Leukemia Virus

MTTP : Microsomal Triglyceride Transfer Protein

N

NANB : Non A Non B

NF- κ B : Nuclear Factor-kappa B

NK : Natural Killer

NPC1L1 : Niemann-Pick C1-like1 cholesterol absorption receptor

NS : Non Structural

NTPase : Nucléoside Triphosphatase

O

OAS : 2',5'-oligoadénylatesynthetase

OCLDN : Occludin

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

ORF : Open Reading Frame

P

pDC : Plasmacytoid Dendritic Cells

pH : Potentiel Hydrogène

PI4KIII : Phosphatidyl-inositol-4-kinase-III

PI4P : phosphatidylinositol-4-phosphate

PKR : Protéine Kinase R

PLA2G4 : MAPK-regulated cytosolic phospholipase A2

PRR : Pattern Recognition Receptors

R

RDRP : RNA-dependent RNA polymerase

RE : Reticulum Endoplasmique

RIG : Retinoid acid Inducible Gene

RT-PCR : Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction

RTK : Receptor Tyrosine Kinases

S

SCID : Severe Combined Immune Deficiency

SEL : Small Extracellular Loop

siRNA : small interfering Ribonucleic Acid

SR-BI : Scavenger Receptor class B member 1

SVR : Sustained Virologic Response

T

TfR1 : Transferrine Receptor 1

TIP47 : Tail-Interacting Protein 47

TLR : Toll-like receptors

TMA : Transcription-Mediated Amplification

TMD : Transmembrane Domain

TNF : Tumor Necrosis Factor

TRIF : TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β

U

UI : Unité Internationale

UTR : untranslated regions

V

VAP : Vesicle-Associated membrane protein-associated Protein

VLDL : Very Low-Density Lipoproteins

VSV G : Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein E

VSVG : Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein

W

WT : Wild Type

Résumé

Du fait de leur présence à la surface de la particule virale, les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 du virus HCV jouent un rôle essentiel dans sa morphogenèse ainsi que lors de son entrée dans la cellule hôte. Jusqu'à récemment, les travaux de recherche sur les glycoprotéines d'enveloppe du virus HCV se sont essentiellement focalisés sur E2 car elle est la protéine d'attachement du virus. De plus, elle est la cible majeure des anticorps neutralisants et il a été longtemps postulé qu'elle était la protéine de fusion du virus. Cependant, les récentes publications de la structure de E2 ne mettent pas en évidence la présence d'un peptide de fusion et sa structure ne correspond pas aux critères attendus pour une protéine de fusion, suggérant que la glycoprotéine E1 seule ou en association avec E2 pourrait être responsable de l'étape de fusion. La structure de la région N-terminale de E1 (acides aminés 192 à 270) a récemment été résolue et a mis en évidence la présence d'une épingle à cheveux formée par 2 feuillets beta ($\beta 1$ et $\beta 2$) suivie par un segment de 16 acides aminés qui forme une hélice alpha ($\alpha 1$) flanquant 3 feuillets beta antiparallèles ($\beta 3$, $\beta 4$ et $\beta 5$). En plus de la caractérisation de ces structures secondaires de E1, une région qui se situe au milieu de la protéine (approximativement entre les résidus 274 et 292) a été proposée avoir un rôle actif au cours du processus de fusion et elle pourrait correspondre à un peptide de fusion.

Nous nous sommes basés sur ces travaux récents pour investiguer le rôle fonctionnel de la glycoprotéine E1 par une approche de mutagenèse dirigée des résidus conservés dans la région N-terminale et dans la région du potentiel peptide de fusion, dans le contexte d'un clone infectieux du HCV. Comme attendu, nos résultats indiquent que ces mutations introduites dans E1 n'ont aucun effet sur la réplication virale. Cependant, vingt-et-un parmi les vingt-huit mutants produits conduisent à une atténuation ou une perte de l'infectiosité virale. D'une manière très intéressante, deux mutants atténués, le T213A et le I262A, se sont montrés moins dépendants au co-récepteur claudine-1. D'autre part, nous avons montré que ces mutants utilisent un autre récepteur de la famille des claudines (claudine-6) pour l'entrée virale, indiquant ainsi un changement de dépendance à son co-récepteur claudine-1. A l'opposé, deux autres mutants, le L286A et le E303A, se sont révélés avoir une plus grande dépendance au co-récepteur claudin-1 pour l'entrée dans les cellules d'hépatome. Au cours de ce travail, nous avons également identifié une mutation intéressante à proximité du potentiel peptide de fusion. Cette mutation, G311A, conduit à la sécrétion de particules virales entières mais non infectieuses, suggérant un défaut d'entrée cellulaire pour ce virus. De façon très surprenante, nous avons également identifié une mutation (D263A) qui conduit à la sécrétion de particules virales dépourvues d'ARN génomique. Une caractérisation plus poussée de ce mutant a de plus révélé une modification dans la co-localisation subcellulaire entre l'ARN viral et la glycoprotéine E1, mettant en évidence pour la première fois un dialogue croisé entre E1 et l'ARN génomique du HCV lors de la morphogenèse du virus.

En conclusion, nos observations permettent d'identifier précisément les régions spécifiques de la protéine E1 qui jouent un rôle dans l'assemblage et l'entrée du virus dans la cellule, mettant en évidence le rôle majeur de la glycoprotéine E1 au niveau des différentes étapes du cycle infectieux du HCV.

Abstract

Being part of the viral particle, HCV envelope glycoproteins E1 and E2 play an essential role in virion morphogenesis as well as in HCV entry into liver cells. These glycoproteins form a non-covalent heterodimer, and until recently, research on HCV envelope glycoproteins has been mainly focused on E2. Indeed, this glycoprotein is the receptor-binding protein, it is also the major target of neutralizing antibodies and it was postulated to be the fusion protein. However, the recent publications of the structure of E2 do not show the presence of a fusion peptide and its structure does not fit with what one would expect for a fusion protein, suggesting that E1 alone or in association with E2 might be responsible for the fusion step. Concerning E1, only the crystal structure of the two-fifth N-terminal region, comprising amino acids 192 to 270, has been reported. This partial structure reveals a complex network of covalently linked, intertwined homodimers. The overall fold of the N-terminal E1 monomer consists of a beta-hairpin ($\beta 1$ and $\beta 2$) followed by a segment composed of a 16 amino-acid long alpha-helix ($\alpha 1$) flanking a three-strand antiparallel beta-sheet ($\beta 3$, $\beta 4$ and $\beta 5$). In addition to the characterization of secondary structures within E1, a region located in the middle of the polypeptide (approximately between a.a. 274 and 292) has been suggested to play an active role during the fusion process and might potentially act as a fusion peptide.

We took advantage of these recently published data to further investigate the functional role of HCV glycoprotein E1 by using a site-directed mutagenesis approach targeting conserved amino acids in the N-terminal region as well as in the region postulated to contain the fusion peptide in the context of an infectious clone. As expected, our results indicate that these mutations have no effect on virus replication. However, twenty-one out of twenty-eight mutations led to attenuation or inactivation of infectivity. Interestingly, two attenuated mutants, T213A and I262A, were less dependent on tight junction protein claudin-1, a co-receptor for HCV. Instead, these mutant viruses relied on another claudin (claudin-6) for cellular entry, indicating a shift in receptor dependence. In contrast, two other mutants, L286 and E303, were more dependent on claudin-1 for cellular entry into hepatoma cells. We also identified an interesting mutation downstream of the putative fusion peptide, G311A, which leads to the release of non-infectious particles having a defect in cellular entry. Finally, an unexpected phenotype was also observed for D263A mutant, which was no longer infectious but led to the secretion of viral particles devoid of genomic RNA. Further characterization of the D263A mutant revealed a change in subcellular co-localization between HCV RNA and E1, highlighting for the first time a crosstalk between HCV glycoprotein E1 and the genomic RNA during HCV morphogenesis.

In conclusion, our observations allowed for the identification of specific regions in the E1 glycoprotein that play a role in virion assembly and entry, highlighting the major role played by this protein at different steps of the HCV infectious cycle.

Introduction

I. L'hépatite C

I.1. Le foie et les hépatites virales

I.1.a. Les hépatites virales

L'hépatite virale est une inflammation du foie causée par un virus. Différents virus, tels que les virus des hépatites A à E, peuvent conduire au développement d'une hépatite. Cependant, l'infection reste indifférentiable en l'absence de tests sérologiques. Tous les virus hépatiques causent une hépatite aiguë qui pour les virus des hépatites B, C et D peut évoluer en une hépatite chronique persistant pendant plusieurs années, voire toute la vie. Des cas plus rares d'hépatite chronique causée par le virus de l'hépatite E ont également été observés chez des patients immunodéprimés (bihi & negro, 2009). A long terme, l'hépatite chronique peut conduire à une cirrhose, une fibrose, une insuffisance hépatique et un carcinome hépatocellulaire. Bien qu'ils soient responsables des mêmes maladies, les virus hépatiques appartiennent à des familles virales différentes. Il est à noter que d'autres virus, comme le virus Epstein-Barr et le cytomégalovirus, peuvent également conduire à une hépatite virale.

I.1.b. Le foie: organisation et fonctions

Le foie est l'organe interne le plus volumineux dans le corps humain, il compte à peu près 2 à 3 % du poids corporel total (Abdel-Misih & Bloomston 2010 ; McMillan, 2008). Cet organe présente une forme ovoïde. Sa couleur rouge foncé reflète sa forte vascularisation (Gray & Lewis, 2000). Positionné dans le quadrant supérieur droit de la cavité abdominale sous le diaphragme, le foie est protégé par la cage thoracique et maintient sa position avec le soutien de plusieurs ligaments (Abdel-Misih & Bloomston, 2010 ; Bismuth, 2013; Hoekstra et al., 2013 ; Tahara & Shibata, 2016).

Le foie assure un grand nombre de fonctions (figure 1). Parmi elles, figurent le maintien de l'homéostasie en glucose, la synthèse de lipides, d'acides aminés non essentiels et de protéines, le stockage des nutriments, le catabolisme de protéines, l'élimination de molécules toxiques circulant dans le sang (Jackson & Whitfield, 1985) (figure 1). Ainsi, le foie permet l'élimination de l'ammoniaque qui constitue un neurotoxique puissant, sous forme d'urée, qui est relarguée dans l'urine. De plus, la production de la bile lors de la phase initiale de la digestion est une fonction importante du foie (McMillan, 2008). La bile favorise la digestion

des lipides et est responsable de la dilution et de la neutralisation de l'acide gastrique. Elle permet d'élever le pH à des niveaux nécessaires à l'activité des enzymes pancréatiques. Le foie est également responsable de l'anabolisme de nombreuses protéines plasmatiques telles que l'albumine, le fibrinogène, l'héparine, les globulines et les facteurs de coagulation, ainsi que l'homéostasie hormonale (McMillan, 2008 ; Seeley et al., 2003).

Environ 80% de la masse hépatique totale est constituée de cellules polyédriques, les hépatocytes, qui sont les principales cellules du foie et sont fortement impliqués dans plusieurs processus métaboliques (Bismuth, 2013 ; Hoekstra et al., 2013). Ces cellules peuvent absorber une grande partie du glucose qui pénètre dans le foie à travers la veine porte hépatique et le stocker sous forme de glycogène, ce qui maintient l'homéostasie glycémique (Jackson & Whitfield, 1985; Ganong, 2005). Les hépatocytes stockent aussi temporairement des graisses, des vitamines (A, B12, D, E et K), du cuivre, du fer (Seeley et al., 2003) et métabolisent les nutriments, en fonction des besoins du corps humain (figure 1).

De manière intéressante dans le contexte de la pathogenèse de l'infection par le HCV, les hépatocytes jouent un rôle clé dans le métabolisme lipidique et le métabolisme des lipoprotéines. Tout d'abord, le foie produit de l'énergie de manière efficace grâce à l'oxydation des triglycérides, et exporte les intermédiaires riches en énergie à d'autres tissus. De plus, il est capable de convertir les glucides et les protéines en excès en lipides qui seront exportés et stockés dans les tissus adipeux. Par conséquent, le foie synthétise de grandes quantités de cholestérol, de triglycérides et de phospholipides. Certains sont incorporés dans les lipoprotéines et transportés vers le reste du corps (Lee et al., 2008). Le reste est excrété dans la bile.

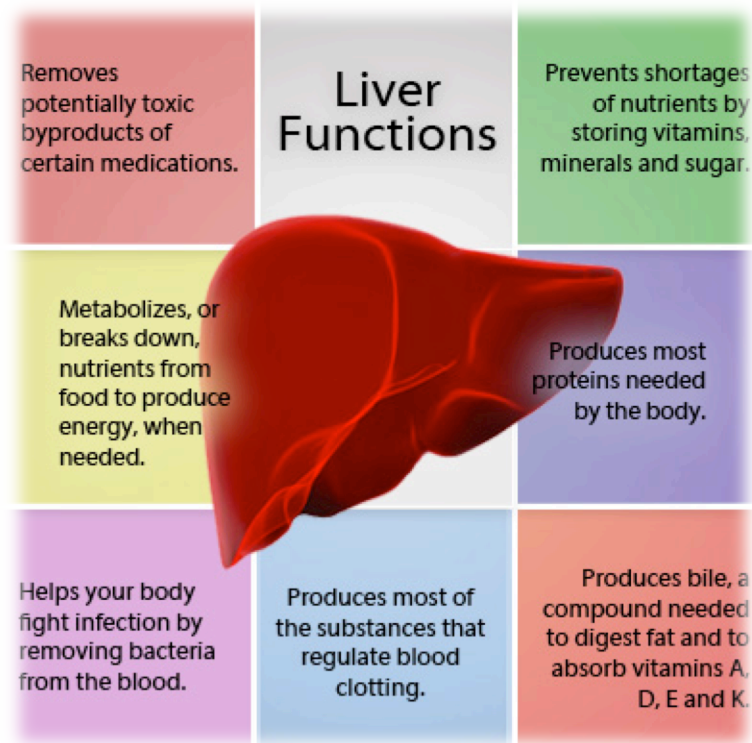


Figure 1. Représentation des différentes fonctions du foie. Le foie joue un rôle dans la sécrétion et le stockage de plusieurs molécules ainsi que dans l'élimination de l'infection du sang. Il sécrète également certains facteurs essentiels pour la coagulation du sang.

I.2. L'Hépatite C

I.2.a. Identification et épidémiologie de l'hépatite C

I.2.a.i. Identification de l'hépatite C

Au début des années 1970, deux agents viraux responsables d'hépatites post-transfusionnelles étaient identifiés et pouvaient être diagnostiqués : le virus de l'hépatite A (HAV) (Bayer et al., 1968) et le virus de l'hépatite B (HBV) (Feinstone et al., 1973). Cependant, un nombre important de cas d'hépatites post-transfusionnelles n'était pas lié à l'infection par ces virus. Par conséquent, ces hépatites ont été classées comme "hépatite non-A, non-B (NANB)". En 1989, l'identification du virus de l'hépatite C a pu être réalisée par la génération d'une banque d'ADNc à partir du sérum d'un chimpanzé infecté suivie du criblage des séquences cibles à l'aide d'anticorps provenant de patients infectés (Choo et al., 1989). Cette découverte a permis de développer des tests de diagnostic du HCV qui ont considérablement réduit le risque d'infection par le virus.

I.2.a.ii. Épidémiologie du HCV

L'infection par le HCV constitue un problème majeur de santé publique, conduisant au développement de plusieurs maladies hépatiques, comme la fibrose, la cirrhose, l'insuffisance hépatique et le carcinome hépatocellulaire (CHC) (Saito et al., 1990). Le HCV infecte jusqu'à 3% de la population mondiale, soit environ 170 millions de personnes et, chaque année, plus de 350 000 personnes meurent des conséquences d'une infection par le HCV (Mohd Hanafiah et al., 2013). L'hépatite B et C, représentent 75% de tous les cas de maladies du foie dans le monde (Ananthakrishnan et al., 2006).

Plusieurs études épidémiologiques montrent que la prévalence du HCV varie d'une région à l'autre dans le monde. Le Moyen-Orient et l'Afrique du Nord ont des niveaux élevés de prévalence > 3,5 %. L'Asie centrale, l'Australie et l'Afrique subsaharienne ont une prévalence modérée entre 1,5 et 3,5 % alors que l'Europe, l'Amérique latine et l'Amérique du Nord ont des niveaux faibles de prévalence < 1,5 % (figure 2). La prévalence la plus élevée de l'hépatite C se trouve dans la région de la Méditerranée orientale, en particulier en Égypte, où l'infection par le HCV est signalée chez 10 à 50% de la population en général (Strickland et al., 2006 ; Thomas, 2013).

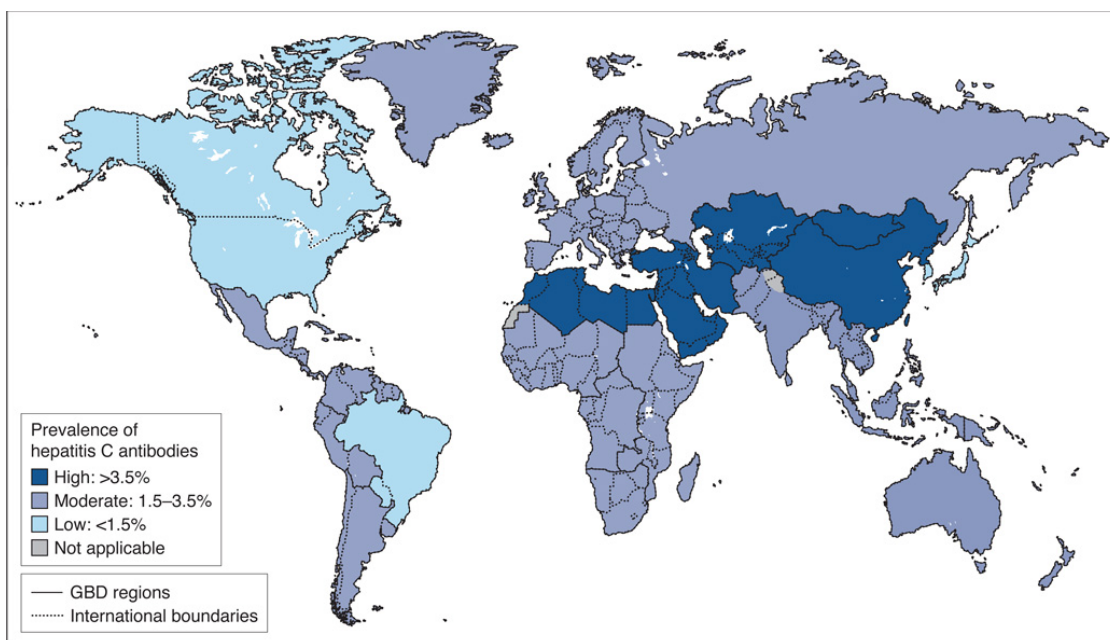


Figure 2. Prévalence des anticorps anti-HCV dans le monde entier. Ces données sont les résultats de 232 études réalisées entre 1997-2007 et présentées dans le revue du Thomas, 2013. GBD-Global Burden of Diseases.

I.2.b. Modes de transmission

L'exposition parentérale au HCV constitue le mode de contamination majeur. Jusqu'en 1990, les transfusions sanguines constituaient la principale source de contamination mais différentes mesures préventives ont permis de la réduire considérablement dans les pays industrialisés: l'inactivation virale des produits sanguins à partir de 1987, l'élimination des dons d'individus à risque dès 1988 et des dons d'individus séropositifs grâce aux dépistages mis en place après 1990 (Roudot-Thoraval, 2002).

A l'heure actuelle, dans les pays industrialisés, le risque majeur de contamination est lié au partage de seringues ou autres matériels dans les populations toxicomanes malgré des mesures de prévention mises en place. Cependant aujourd'hui, la prise en charge et le suivi des toxicomanes avec notamment la mise à disposition de matériel stérile permet de diminuer les contaminations.

Le HCV peut également se transmettre à l'occasion des pratiques culturelles telles que les tatouages, les piercings ou l'acupuncture, réalisées avec du matériel non ou mal stérilisé (Hajarizadeh et al., 2013). Les transmissions par voie périnatale ou sexuelle sont relativement peu fréquentes. Les cas de transmissions sexuelles sont généralement observés chez des personnes ayant des activités hétérosexuelles ou homosexuelles avec de multiples partenaires (Bruggmann et al., 2014 ; Hajarizadeh et al., 2013). Une transmission des mères porteuses du HCV à leur enfant est rapportée dans 4 à 7% des cas (Roberts & Yeung, 2002).

Les facteurs de risque n'étant pas toujours clairement identifiables, le mode de contamination demeure inconnu dans 20% des cas.

I.2.c. Pathologie de la maladie

La première phase de l'infection par le HCV correspond à une hépatite aiguë qui est le plus souvent asymptomatique. Cette phase évolue dans 80% des cas vers la chronicité. A plus long terme, l'hépatite chronique peut conduire au développement d'une cirrhose qui peut évoluer vers un hépatocarcinome.

I.2.c.i. Hépatite aiguë

La phase aiguë de l'infection par le HCV est caractérisée par l'apparition de marqueurs biologiques dans le sang. Notamment, l'ARN viral devient détectable 1 à 3 semaines après contamination (figure 3). On observe également fréquemment une augmentation transitoire de

la concentration sérique en alanine aminotransférases et la séroconversion intervient sous 6 à 8 semaines (figure 3) (Bowen & Walker, 2005 ; Cox et al., 2005 ; Thimme et al., 2001). L'hépatite aigüe est asymptomatique chez 80% des sujets infectés. Dans le reste des cas, cette phase est associée aux signes cliniques classiquement observés lors d'hépatites virales : jaunisse, fièvre, urines foncées, fatigue, perte d'appétit et nausées (Alric et al., 1997 ; Grebely et al., 2014). Dans la plupart des cas, ces symptômes sont transitoires et leur manifestation coïncide avec l'élévation des transaminases sériques. Environ 25% des patients ayant une hépatite aigüe guérissent spontanément mais l'infection progresse vers la phase chronique chez la plupart des patients (70-75%) (Maasoumy & Wedemeyer, 2012). L'élimination du virus est plus efficace chez les personnes qui développent des symptômes pendant la phase aiguë, alors que l'infection persistante s'établit dans le cas où la phase aiguë est asymptomatique (Gerlach et al., 2003).

Les cas d'hépatite fulminante dus à l'infection par le HCV sont extrêmement rares (Farci et al., 1996).

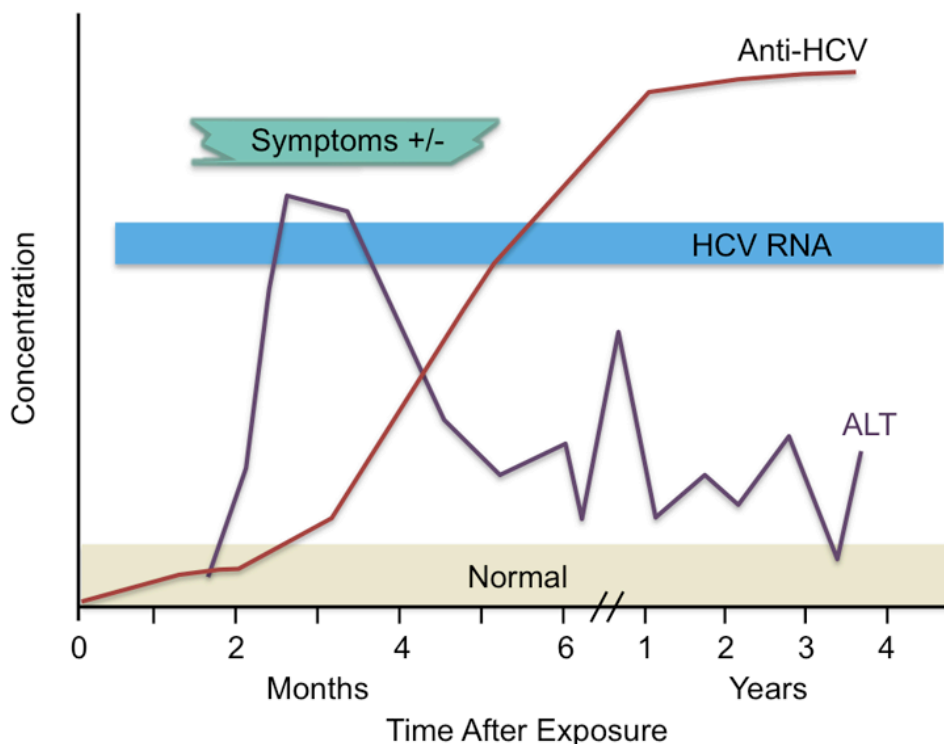


Figure 3. Les marqueurs du laboratoire durant une infection aiguë du HCV. L'ARN viral est détectable très tôt après l'infection par le virus suivie par une augmentation du taux d'ALT et enfin vers les 4 à 6 mois qui suivent l'infection les anticorps anti-HCV seront détectables. (CDC).

I.2.c.ii. Hépatite chronique

Dans la plupart des cas, les symptômes de l'hépatite aiguë disparaissent mais le virus persiste chez les patients (Galossi et al., 2007). L'infection chronique par le HCV est diagnostiquée lorsque l'ARN du HCV persiste dans le sang du patient pendant plus de six mois après le début de l'infection aiguë et que les anticorps contre le HCV sont détectables. Au cours du stade chronique de la maladie, une charge virale persistante et relativement stable est détectée. Il est estimé que $\sim 10^{12}$ virions sont produits par jour (Herrmann et al., 2000 ; Neumann et al., 1998). Les niveaux des enzymes hépatiques ALT et de la virémie ne sont pas nécessairement corrélés au degré de lésion hépatique.

L'établissement d'une infection chronique dépend d'un certain nombre de facteurs de risques tels que le génotype viral (Bochud et al., 2009), l'âge, le sexe, la consommation d'alcool et la coinfection avec le HIV ou le HBV (Lauer & Walker, 2001).

Les personnes infectées chroniquement peuvent rester sans symptômes pendant des dizaines d'années ou présenter des symptômes intermittents semblables à ceux de la phase d'hépatite aiguë. Cependant, elles présentent un risque élevé de développer une maladie sévère du foie comme la stéatose, la fibrose, la cirrhose et le carcinome hépatocellulaire caractérisé par un taux de mortalité de 1 à 5% sans traitement (Yoon & Hu, 2006) (figure 4). Généralement, l'intervalle de temps entre l'infection et l'apparition d'une maladie symptomatique du foie se situe entre 20 et 40 ans (figure 4). Le HCV est estimé être la cause du cancer du foie chez 25% des patients souffrants de cette maladie et la cause la plus fréquente de transplantation hépatique dans le monde (Brown, 2005). Cependant, la réinfection du greffon hépatique est très fréquente entraînant l'endommagement et la perte du nouveau foie (Hsu et al., 2013).

Les mécanismes moléculaires qui conduisent le HCV à induire un carcinome hépatocellulaire restent peu caractérisés (Levrero et al., 2006). Le virus ne s'intègre pas dans le génome cellulaire. Cependant certaines protéines virales pourraient jouer un rôle direct dans la transformation cellulaire. La protéine de capsid est notamment un candidat oncogène fréquemment rapporté. Par ailleurs le stress oxydatif généré par l'expression des protéines virales et la réponse inflammatoire prolongée sont susceptibles d'endommager l'ADN et de conduire à la transformation cellulaire.

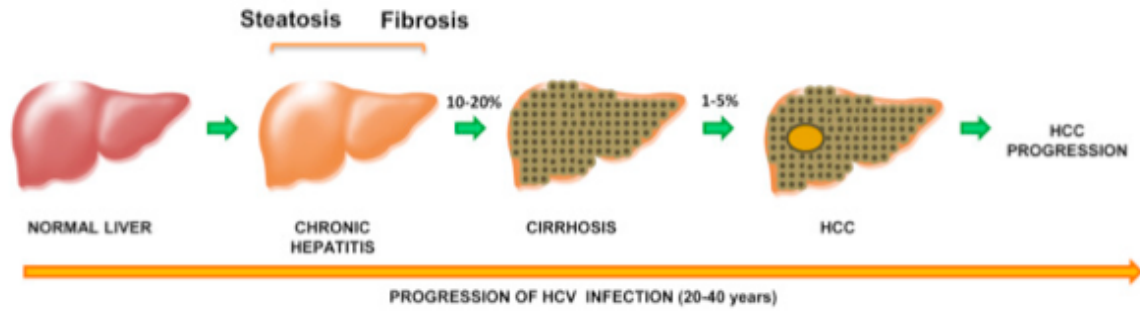


Figure 4. Représentation de l'évolution de l'infection par le HCV durant l'hépatite chronique. L'intervalle de temps entre l'infection et l'apparition d'une maladie symptomatique du foie est entre 20 et 40 ans. Tout d'abord, les symptômes commencent par une stéatose ou une fibrose. 10 à 20 % des patients ayant une fibrose développent une cirrhose hépatique. 1 à 5% des individus possédant une cirrhose progressent vers un carcinome hépatocellulaire (Adapté de Vescovo et al., 2016).

I.2.d. Réponse immunitaire contre le HCV

I.2.d.i. Réponse immunitaire innée

La réponse immunitaire innée constitue la première ligne de défense contre le HCV. La réponse innée repose entre autres sur le rôle des cellules NK (pour Natural Killer) et la sécrétion des interférons (IFN) de type I. Cette immunité a pour rôle de détecter le virus, d'initier les réponses antivirales locales dans les cellules infectées et de recruter les cellules immunitaires pour médier la réponse adaptative.

Détection du HCV et induction de la réponse IFNs

La mise en place de la réponse immunitaire innée repose sur la détection de l'agent infectieux par les récepteurs PRR (pour Pattern Recognition Receptor) qui déclenchent plusieurs cascades de signalisation conduisant à l'élimination du virus (Yang & Zhu, 2015). Les principaux récepteurs PRR incluent les récepteurs de type RIG-I (pour Retinoid acid Inducible Gene-I), les récepteurs TLRs (pour Toll-Like Receptors) et des récepteurs non conventionnels.

Le HCV est reconnu par RIG-I à une étape précoce de l'infection. RIG-I détecte la région 3' non traduite de l'ARN. Cette interaction conduit à l'activation de 2 domaines amino-terminaux de recrutement de caspases (CARD) qui déclenchent une cascade de signalisation médiée par l'activation de MAVS (pour Mitochondrial Antiviral Signaling Protein). MAVS

est l'adaptateur commun des récepteurs RLRs et son activation conduit à l'activation des facteurs transcriptionnels clé NF- κ B, IRF3 et IRF7 (pour Interferon Regulatory Factor). Ces facteurs transcriptionnels induisent l'expression des interférons de type I et III.

Le HCV peut être également détecté par les récepteurs TLRs. De manière générale, TLR3, TLR7 et TLR9 détectent les acides nucléiques viraux ; TLR2 et TLR4 reconnaissent les protéines virales (Yang & Zhu, 2015). TLR3 qui est localisé dans les endosomes et exprimé par plusieurs types cellulaires, constitue un senseur de l'ARN double brin du HCV. Les signaux reçus par TLR3 sont transduits via l'adaptateur TRIF qui active IRF3 et NF- κ B conduisant à la production d'IFN de type I et de cytokines et chimiokines proinflammatoires (Takeuchi & Akira, 2009). TLR7 qui est exprimé dans les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) reconnaît les ARN simple brin dérivant du HCV dans les endosomes. Suite à la phagocytose de l'ARN du HCV par les pDC, l'activation de TLR7 déclenche la production d'IFN de type I. L'ARN viral peut être transféré des cellules infectées vers les pDC via les exosomes (Diebold et al., 2004 ; Kawai & Akira, 2011).

Le HCV peut également être détecté par un autre PRR : la PKR (pour Protéine Kinase R). La protéine antivirale PKR est une sérine/thréonine kinase qui régule la synthèse protéique, la prolifération cellulaire, l'apoptose et la transduction de signal (Arnaud et al., 2010). L'interaction de la PKR et de l'ARN viral conduit à l'inhibition de la traduction des ARN messagers de l'hôte et induit l'activation de MAVS (encore appelée IPS-1 ou Cardif ou VISA) conduisant à l'expression de certains gènes ISGs (pour Interferon Stimulated Genes) et de l'IFN β (Arnaud et al., 2010 ; Kumar et al., 1997 ; McAllister et al., 2009).

Les effecteurs de l'immunité innée contre les infections virales sont les produits des ISGs. L'expression de plus de 300 ISGs est régulée par les IFNs via la cascade de signalisation JAK-STAT après interaction avec leur récepteur spécifique. Bien que plusieurs ISGs impliqués dans la réponse anti-HCV aient pu être identifiés, le mécanisme d'action d'un petit nombre d'entre eux seulement a pu être élucidé. Ainsi, l'activation d'une OASs (pour 2',5'-oligoadénylatesynthetase) lors de l'infection conduit à la dégradation de l'ARN viral et cellulaire, ce qui déclenche l'apoptose des cellules infectées (Silverman, 2007). La viperin qui est localisée dans le réticulum endoplasmique et les gouttelettes lipidiques interagit avec les protéines Core et NS5A du HCV et perturbe la réplication virale (Metz et al., 2013). La protéine IFITM1 (pour Interferon Induced Transmembrane Protein 1) interagit avec les corécepteurs du virus CD81 et l'occludine pour inhiber l'entrée du virus (Wilkins et al., 2013).

I.2.d.ii. Stratégie d'échappement à la réponse immunitaire innée

Le virus a évolué pour échapper à l'immunité innée permettant ainsi l'établissement d'une infection chronique. Plusieurs protéines non structurales du HCV contribuent à la résistance vis-à-vis de la réponse anti-virale de l'hôte. Ainsi, le complexe NS3-NS4A bloque les voies de signalisation RIG-I et TLR3 activées par la présence d'ARN double brin dans la cellule en clivant les protéines cellulaires MAVS et TRIF nécessaires à la transduction du signal (Chen et al., 2007). Les protéines NS5A et E2 inhibent l'activité de la protéine PKR qui interfère avec la traduction de l'ARN et active la sécrétion de la chimiokine clé de la réponse immunitaire innée, IL8. De plus, plusieurs autres protéines du HCV interfèrent avec la réponse interféron. Ainsi, la protéine Core inhibe la voie de signalisation JAK-STAT, activée par les IFNs et l'expression des ISGs. E2 et NS5A inhibent la fonction des ISGs (Reherman, 2009). NS4B joue un rôle important en bloquant la production d'IFN β médiée par RIG-I. Finalement, l'ensemble de ces interférences concourt à l'altération des réponses immunitaires innées (Chen et al., 2007 ; Feld & Hoofnagle, 2005 ; Horner et al., 2013 ; Pawlotsky, 2003). En accord avec ces résultats, des biopsies prélevées à partir des chimpanzés avec une infection chronique par le HCV, a montré que les ISGs sont exprimés mais avec un niveau insuffisant pour éliminer le HCV (Su et al., 2002).

I.2.d.iii. Réponse immunitaire adaptative

Le dernier barrage permettant de contrôler l'infection par le HCV est la réponse immunitaire adaptative. Ainsi, la mise en place de la réponse immunitaire innée suite à l'infection permet l'activation des cellules présentatrices d'antigènes et de cytokines qui vont stimuler les réponses immunitaires humorale (différenciation des lymphocytes B et sécrétion d'anticorps) et cellulaire (activation des lymphocytes T cytotoxiques). Cette étape commence 6 à 8 semaines après infection par le HCV (Shin et al., 2011). Dans une minorité de cas, la production précoce d'anticorps neutralisants et la mise en place d'une réponse soutenue anti-HCV des cellules T CD4⁺ et CD8⁺ peut conduire à la clairance du virus (Guidotti & Chisari, 2006). Cependant dans la majorité des cas, le HCV développe des stratégies d'échappement à la réponse immunitaire lui permettant de persister chez l'hôte.

a. Réponse immunitaire humorale

Suite à l'infection par le HCV, les récepteurs des lymphocytes B reconnaissent des antigènes viraux, ce qui conduit à la production d'anticorps dirigés contre le virus. Seule une faible proportion des anticorps produits est capable d'inhiber l'étape d'entrée du virus dans les cellules. Ces anticorps sont appelés anticorps neutralisants (Logvinoff et al., 2004). Les anticorps neutralisants ciblent les glycoprotéines d'enveloppe du virus, E1 et E2, qui sont présentes à la surface de la particule virale. Plusieurs études suggèrent que les anticorps neutralisants jouent un rôle clé dans le contrôle de l'infection et de la réinfection par le HCV. Ainsi, une corrélation a été observée entre la production précoce d'anticorps neutralisants à large spectre au cours de la phase aiguë d'infection et la clairance spontanée du virus (Dowd et al., 2009 ; Osburn et al., 2010 , 2014 ; Pestka et al., 2007 ; Raghuraman et al., 2012 ; Von Hahn et al., 2007). A l'inverse, la persistance du virus est associée à une production d'anticorps neutralisants retardée (Pestka et al., 2007). Dans les cas d'infections chroniques, les anticorps neutralisants participeraient au contrôle du niveau de la charge virale dans le sérum des patients (Ball et al., 2014).

Le HCV a développé différentes stratégies pour échapper à la réponse humorale de l'hôte. La première est basée sur la grande variabilité génétique du virus qui circule sous forme de quasi-espèces. Ainsi, la pression de sélection exercée par les anticorps neutralisants peut favoriser l'émergence de variants résistants (Von Hahn et al., 2007). La présence de glycanes sur les protéines d'enveloppe contribue à diminuer l'accessibilité des épitopes ciblés par les anticorps neutralisants. Plusieurs études montrent que l'association du virus avec les lipoprotéines diminue également la sensibilité du virus aux anticorps neutralisants (Grove et al., 2008). De plus l'apolipoprotéine E qui est présente sur les particules virales est également impliquée dans l'échappement du virus à la neutralisation (Bankwitz et al., 2017). Enfin, la transmission directe du virus de cellules à cellules permettrait de contourner la neutralisation (Brimacombe et al., 2011 ; Timpe et al., 2008).

b. Réponse immunitaire cellulaire

Les cytokines produites lors de la réponse immunitaire innée activent les cellules présentatrices d'antigènes qui activent les lymphocytes T auxiliaires CD4⁺ et les lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺. Des données suggèrent que les cellules dendritiques pourraient être partiellement permissives à l'infection par le HCV. Cela pourrait affecter leurs fonctions de présentation d'antigène et altérer la qualité des réponses T CD4⁺ et T CD8⁺ (Pachiadakis et al., 2005). Les cellules T ciblent plusieurs épitopes des protéines structurales (Core) et non structurales (NS3 et NS4A) (Cooper et al., 1999 ; Thimme et al., 2002). Plusieurs études démontrent l'existence d'une corrélation entre la réponse des cellules T et le contrôle de l'infection (Cooper et al., 1999 ; Diepolder et al., 1997 ; Lechner et al., 2000 ; Missale et al., 1996 ; Takaki et al., 2000 ; Thimme et al., 2001 , 2002). Les lymphocytes T CD8⁺ exercent leur activité antivirale en sécrétant des cytokines proinflammatoires, IFN γ et TNF α et en présentant une activité cytolytique (Tsai et al., 1997). Les lymphocytes CD4⁺ reconnaissent les antigènes viraux et constituent des régulateurs centraux du contrôle de l'infection (Klenerman & Thimme, 2012).

Lors de la phase aiguë d'infection, la réponse T CD4⁺ est détectable dans le sang 3 à 4 semaines après contamination. Certaines études démontrent que l'élimination du virus est associée à une réponse T CD4⁺ rapide, forte et persistante (Takaki et al., 2000) alors que la chronicité est liée à une réponse retardée et plus faible (Gerlach et al., 1999).

Les cellules T CD8⁺ sont détectables 6 à 8 semaines après infection. Leur émergence est suivie d'une augmentation sérique des enzymes du foie, de symptômes cliniques et d'une diminution de la charge virale (Gruner et al., 2000 ; Thimme et al., 2001). Des études suggèrent que l'infection par le HCV affecte la cytotoxicité et la prolifération des cellules T CD8⁺ ainsi que leur capacité à sécréter des cytokines (Neumann-Haefelin et al., 2005). Néanmoins, il semble que la réponse T CD8⁺ participe à la clairance virale (Thimme et al., 2001). Ainsi, les patients éliminant le virus lors de la phase aiguë d'infection présentent des niveaux élevés de lymphocytes T CD8⁺ multispécifiques (Gruner et al., 2000). Pendant la phase chronique un équilibre entre la réponse immunitaire T CD8⁺ et le taux de réplication virale est observé, ce qui limite la production du virus.

La grande variabilité génétique du virus et l'effet inhibiteur de l'infection sur la réponse T CD8⁺ contribuent à l'incapacité de la réponse immunitaire adaptative à éliminer le virus et à l'établissement d'une infection chronique.

I.2.e. Diagnostic de la maladie

Le diagnostic de l'infection virale a pour but de permettre aux personnes infectées par un virus d'être identifiées et traitées. Ainsi, le diagnostic d'une infection virale est très important pour prévenir la progression de la maladie et la propagation du virus. La phase aiguë chez la majorité des patients infectés par le HCV est asymptomatique, de plus les symptômes observés ne peuvent être utilisés comme indicateurs spécifiques de l'infection par le HCV. En effet, par exemple la virémie du HCV pourrait encore exister malgré un niveau d'ALT sérique normal. Par conséquent, les méthodes de détection du virus plutôt que la quantification des niveaux d'ALT sont utilisées pour diagnostiquer l'infection par le HCV (Chevaliez & Pawlotsky, 2009). Ces méthodes comprennent des tests indirects et directs. Les tests indirects consistent à détecter les anticorps induits par une infection virale : les IgM pour une infection récente, les IgG pour une infection récente ou passée. Les tests directs consistent en l'isolement du virus, la détection des antigènes ou des acides nucléiques viraux.

I.2.e.i. Tests indirects

Le principal test permettant la détection d'anticorps anti-HCV est le test ELISA (pour Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) (Chevaliez & Pawlotsky, 2007). C'est souvent le premier test de diagnostic utilisé. Néanmoins, pour les échantillons positifs la réalisation d'un second test de confirmation est nécessaire. Il existe également des tests de dépistage rapides qui peuvent être utilisés sur le terrain à partir de différents types d'échantillons (sérum, salive).

Cependant, les tests virologiques indirects ne peuvent pas différencier les infections en cours des infections antérieures. Pour cela, les méthodes de diagnostic direct sont nécessaires.

I.2.e.ii. Tests directs

Il est difficile de propager les virus de patients en culture cellulaire et l'infection par le virus n'induit pas d'effets cytopathiques clairs. De ce fait, les diagnostics directs consistent en l'amplification de l'acide nucléique viral ou à la détection d'antigène viraux.

a. Les tests de détection de l'ARN viral

Les tests d'amplification (RT-qPCR et TMA) sont couramment utilisés pour détecter la présence de l'ARN du HCV dans les échantillons de patients (Chevaliez & Pawlotsky, 2007 ; Mack et al., 2012 ; Persing et al., 1989 ; Saludes et al., 2014). Celui-ci constitue le marqueur le plus précocement détectable après infection. Il peut être amplifié par RT-PCR (transcription réverse suivie d'une réaction de polymérisation en chaîne) et TMA (amplification utilisant la transcription inverse de l'ARN) (Chevaliez & Pawlotsky, 2007). La détection de ces produits amplifiés peut être obtenue en hybridant les amplicons produits avec des sondes spécifiques. Des méthodes de détection quantitative comme la RT-PCR en temps réel sont aujourd'hui communément utilisées. L'OMS (pour Organisation Mondiale de la Santé) a standardisé la quantification de l'ARN du HCV (Shiffman et al., 2003), en définissant une UI (Unité Internationale) d'ARN du virus, qui est actuellement utilisée dans tous les tests quantitatifs commerciaux de l'ARN du HCV, quelle que soit la technique utilisée (Chevaliez & Pawlotsky, 2009 ; Pawlotsky, 2002).

b. Tests de détection des antigènes de la protéine core

Des tests ELISAs de quantification de la protéine de capsid dans les échantillons sanguins sont disponibles. Actuellement, la détection des antigènes de la protéine core par ELISA peut être entièrement automatisée (Chevaliez et al., 2014 ; Morota et al., 2009). De plus, il existe une corrélation entre la concentration des antigènes de la protéine core et le taux d'ARN du HCV.

I.2.e.iii. Le génotypage

La réponse aux traitements antiviraux varie avec le génotype du virus (Chevaliez & Pawlotsky, 2009). Ainsi, l'identification du génotype viral du patient est importante pour déterminer la thérapie antivirale la mieux adaptée (Mack et al., 2012). Deux méthodes permettent le génotypage du virus :

- **La méthode sérologique:** le génotype du HCV peut être déterminé avec la détection des anticorps spécifiques anti-HCV en utilisant une technique d'EIA (pour Enzyme Immunoassays) compétitive (Pawlotsky et al., 1997). Actuellement, le test disponible

(sérotypage Murex HCV 1-6 HC02, Abbott Laboratories, North Chicago, Illinois) pourrait identifier les six géotypes du HCV (1-6) mais pas les sous-types (Montenegro et al., 2013).

- **Les techniques moléculaires:** la méthode standard pour le géotypage du HCV est le séquençage du génome au niveau des régions core / E1 ou NS5B suivie par un analyse phylogénétique (Murphy et al., 2007). Plusieurs tests approuvés de géotypage du HCV sont également disponibles dans le commerce (Chevaliez & Pawlotsky, 2012 ; Saludes et al., 2014). Certains de ces tests sont basés sur une amplification PCR classique suivie d'une hybridation inverse avec des sondes spécifiques fixées sur des membranes.

I.2.e.iv. Le sous-typage

Le sous-typage du HCV est important pour les études épidémiologiques, en particulier dans le cas d'épidémies, mais il n'est pas considéré comme cliniquement pertinent pour le traitement par l'interféron- α et la ribavirine. Cependant, le sous-typage peut s'avérer cliniquement utile à l'ère des nouvelles thérapies utilisant des antiviraux à action directe (DAAs « pour Direct Acting Antivirals »). Par exemple, les études conduites sur le télaprévir, le boceprevir, le faldaprevir et le siméprevir ont révélé des taux de SVR (pour Sustained Virologic Response) (caractérisée par l'absence du HCV douze semaines après l'achèvement du traitement) inférieurs pour le sous-type 1a du HCV par rapport au sous-type 1b (Schneider et al., 2014). Ces résultats ont conduit au développement d'un test d'hybridation inverse permettant de différencier les sous-types 1a et 1b du HCV (Chevaliez et al., 2009).

I.2.f. Traitements

I.2.f.i. Evolution des traitements

Le but principal des thérapies anti-HCV chez les patients chroniquement infectés est la prévention de la progression vers une cirrhose et le développement d'un CHC. Le traitement de l'infection chronique par le HCV a radicalement changé au cours de ces 5 dernières années.

Pendant longtemps, les traitements ont consisté en l'administration d'interféron alpha pégylé (PEG-IFN α) et de ribavirine. L'interféron alpha permet de renforcer la réponse antivirale de

l'hôte. La conjugaison de l'IFN au polyéthylène-glycol augmente sa stabilité dans le sang. La ribavirine est un analogue de la guanosine renforçant l'activité antivirale de l'interféron (Feld & Hoofnagle, 2005 ; Pawlotsky et al., 2004). Ce traitement permettait l'obtention d'une réponse virologique prolongée, correspondant à la disparition de l'ARN viral dans le sang 6 mois après arrêt du traitement chez 50% des patients infectés par le génotype 1 et 80% des patients présentant le génotype 2 (Zeuzem, 2008). Cependant, les effets secondaires associés étaient importants (nausées, perte de poids, fatigue et dépression).

Suite à l'isolement du HCV, de nombreux outils de culture cellulaire ont pu être développés pour caractériser le cycle viral. Ces différents systèmes ont permis d'identifier des inhibiteurs spécifiques du HCV appelés agents antiviraux à action directe (DAA). La plupart de ces agents ciblent l'étape de réplication du virus. La première génération de DAAs (boceprévir et télaprévir) qui inhibe spécifiquement l'action de la sérine protéase du HCV (NS3-4A), a été introduite en 2011 (Jacobson et al., 2011 ; Poordad et al., 2011). Ces molécules ont été co-administrées avec le PEG-IFN α et la ribavirine aux patients infectés par le génotype 1 du HCV (figure 5). Cette première génération d'inhibiteurs a permis une nette amélioration de l'efficacité des traitements. Cependant, ces traitements induisaient de sévères effets secondaires et l'apparition de virus résistants. En 2014, une deuxième génération d'inhibiteurs de la protéase NS3-4A a pu être développée. Ces DAAs présentent une activité pangénotypique, une barrière génétique à l'apparition de virus résistants supérieure et une moins grande toxicité (Jacobson et al., 2014). Plusieurs inhibiteurs de la protéase NS3-4A sont encore en phase d'évaluation clinique (Deutsch & Papatheodoridis, 2010 ; Koklu et al., 2017 ; Kumada et al., 2016 ; Zeuzem et al., 2012).

Les inhibiteurs de protéase constituent des antiviraux puissants et sont devenus les composants incontournables de tous les traitements des hépatites C chroniques de génotype 1. Cependant, le site actif de NS3 étant peu conservé parmi les génotypes, la recherche de molécules ciblant d'autres protéines virales a été nécessaire (Clark et al., 2013) pour élargir le spectre d'action des traitements.

Ainsi, des inhibiteurs de la protéine NS5A ont pu être développés. Ils se lient au domaine I de la protéine, affectant ses fonctions lors de la réplication et de l'assemblage du virus (Gao et al., 2010 ; Guedj et al., 2013). La première génération d'inhibiteurs de NS5A est principalement efficace contre le génotype 1. Le daclatasvir est le premier inhibiteur de NS5A mis sur le marché (Pol et al., 2012). Il est bien supporté par les patients et est actuellement administré en combinaison avec un inhibiteur de la polymérase NS5B, le sofosbuvir ou un

inhibiteur de NS3-4A, l'asunaprevir (Manns et al., 2014 ; Osinusi et al., 2013 ; Sulkowski et al., 2014). Une deuxième génération d'inhibiteurs de NS5A a vu le jour récemment. Ils présentent une forte activité antivirale contre tous les génotypes et induisent peu de résistance (elbasvir, velpatasvir, samatasvir). Finalement, les inhibiteurs de NS5A présentent un plus large spectre une meilleure tolérance que les inhibiteurs de protéase.

Le troisième groupe d'inhibiteur du HCV correspond aux inhibiteurs de la RdRp (pour RNA-dependent RNA polymerase) NS5B. Ils sont divisés en deux catégories : les inhibiteurs nucléosidiques et non nucléosidiques. Les analogues nucléosidiques sont incorporés lors de la synthèse de la chaîne d'ARN viral et bloquent l'élongation de celle-ci. Les inhibiteurs non nucléosidiques se fixent sur un des sites allostériques de l'enzyme induisant un changement conformationnel qui inhibe son activité. Du fait de la conservation du site actif de RdRp NS5B, les inhibiteurs nucléosidiques sont efficaces contre une large gamme de génotypes. La séquence du site actif tolérant peu de variabilité, ces antiviraux induisent peu de mutations de résistance (Pawlotsky et al., 2012). Cependant, ces inhibiteurs peuvent interférer avec l'ARN polymérase mitochondriale et s'avérer toxiques. Parmi ces inhibiteurs, le sofosbuvir présente une grande efficacité contre une large gamme de génotypes, une grande résistance à l'apparition de mutants de résistance et une faible toxicité (Lam et al., 2012). Cette molécule est une pro-droque qui après métabolisation par le foie constitue un analogue nucléosidique triphosphate de l'uridine qui est pharmacologiquement actif. Elle entre dans la composition de la plupart traitements actuels contre le HCV (Lam et al., 2012).

Les inhibiteurs non nucléosidiques de NS5B ont une efficacité limitée principalement contre le génotype 1 et présentent une faible barrière de résistance.

Ces différentes molécules anti-virales sont généralement utilisées en combinaison pour améliorer l'efficacité du traitement (tableau 1).

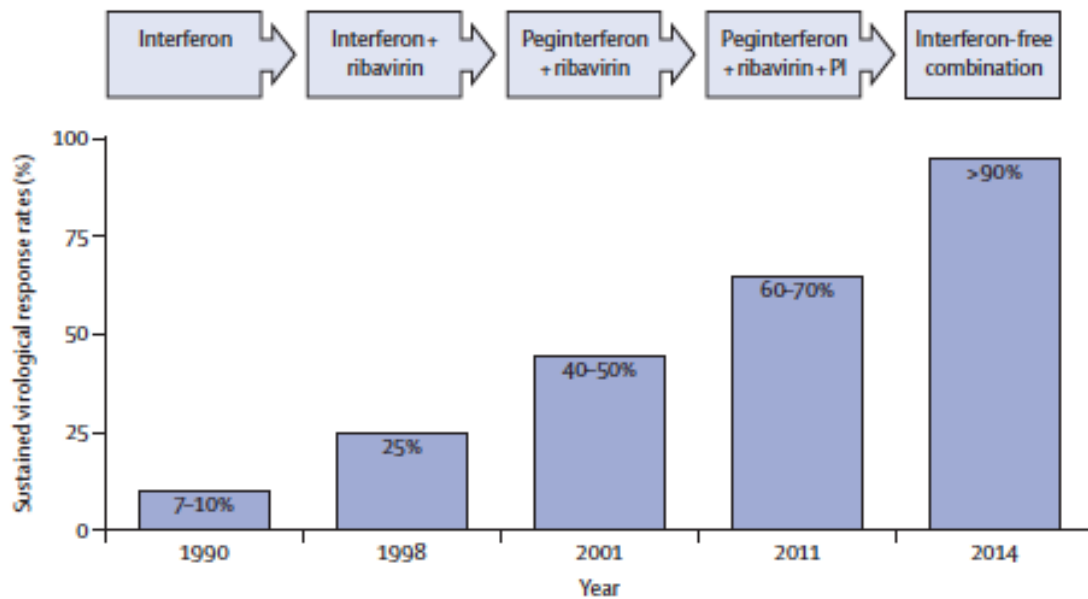


Figure 5. Evolution des traitements depuis l'identification du virus HCV. Le taux de guérison de la maladie a augmenté considérablement au cours des années pour atteindre plus de 90% avec l'introduction des traitements sans interférons vers l'année 2014. PI : Inhibiteurs des protéases (D'après Webster et al., 2015).

Tableau 1. Caractéristiques des DAAs de la deuxième génération. Ce tableau montre les cibles ainsi que les indications cliniques des antiviraux (DAAs) de la deuxième génération.

Molécule	Class	Target	Genotype	Association
Simeprevir	Non-nucleoside polymerase inhibitor	NS3/4A protease	Genotype 1,4	Sofosbuvir
Grazoprevir	Non-nucleoside polymerase inhibitor	NS3/4A protease	Genotype 1,4	Elbasvir
Paritaprevir	Non-nucleoside polymerase inhibitor	NS3/4A protease	Genotype 1,4	Ombitasvir + ritonavir +/- dasabuvir
Daclatasvir	Non-nucleoside polymerase inhibitor	NS5A	Genotype 1, 2, 3	Sofosbuvir
Elbasvir	Non-nucleoside polymerase inhibitor	NS5A	Genotype 1,4	Grazoprevir
Ledipasvir	Non-nucleoside polymerase inhibitor	NS5A	Genotype 1,4	Sofosbuvir
Ombitasvir	Non-nucleoside polymerase inhibitor	NS5A	Genotype 1,4	Paritaprevir + ritonavir +/- dasabuvir
Velpatasvir	Non-nucleoside polymerase inhibitor	NS5A	Pangenotypic	Sofosbuvir
Dasabuvir	Non-nucleoside polymerase inhibitor	NS5B	Genotype 1	Ombitasvir + paritaprevir + ritonavir
Sofosbuvir	Nucléotide polymérase inhibitor	NS5B	Pangenotypic	Ledipasvir Daclatasvir Simeprevir Velpatasvir

I.2.f.ii. Développement d'un vaccin?

Le développement d'un vaccin serait le meilleur moyen d'éradiquer de manière définitive le HCV. Cependant, plusieurs difficultés sont à surmonter pour atteindre cet objectif. Parmi elles figurent la grande variabilité génétique du virus (7 génotypes qui diffèrent de plus de 30%), le taux d'apparition de mutations élevé lors de la réplication virale, les différents mécanismes d'échappement du virus à la réponse immunitaire adaptative ou innée et enfin l'absence de modèle de petit animal immunocompétent (Smith et al., 2014).

Des vaccins thérapeutiques et prophylactiques présentent un intérêt pour prévenir ou traiter les infections par le HCV. Il existe deux approches pour développer un vaccin prophylactique contre le HCV : la première consiste à utiliser les glycoprotéines d'enveloppes E1E2 pour induire la production d'anticorps neutralisants ; la deuxième consiste à utiliser des protéines virales non structurales conservées pour activer une réponse des cellules T. Plusieurs études suggèrent que la production d'anticorps neutralisants corrèle avec l'élimination du virus.

Une des limitations au développement d'un vaccin thérapeutique est le dysfonctionnement des cellules T spécifiques du HCV. La réactivation de ces cellules est nécessaire pour permettre leur recrutement vers le foie où elles peuvent exercer leur activité antivirale en sécrétant des cytokines ou en détruisant les cellules infectées (Law et al., 2013).

Malgré de nombreuses tentatives, seuls quelques vaccins pour la majeure partie thérapeutiques sont actuellement en phase clinique d'évaluation : ChronVac-C (plasmide exprimant NS3/4A), TG4040 (vecteur viral exprimant NS3 à NS5B) et GI-5005 (protéine de fusion entre Core et NS3). Ils pourraient être acceptés pour le traitement des infections chroniques en association avec d'autres thérapies (Habersetzer et al., 2011 ; Roohvand & Kossari, 2012 ; Zingaretti et al., 2014).

L'objectif des vaccins prophylactiques développés est d'induire une réponse immunitaire humorale permettant de prévenir l'établissement de la chronicité. Ces vaccins sont principalement basés sur l'utilisation des glycoprotéines d'enveloppe (E1 et E2) du virus comme antigène. E1 et E2 constituent la principale cible de la réponse immunitaire humorale au cours de l'infection par le HCV, induisant la production d'une gamme d'anticorps neutralisants (Ball et al., 2014 ; Sautto et al., 2013). Jusqu'à présent, seuls deux vaccins ont fait l'objet d'essais en phase clinique. Le premier développé par Chiron (aujourd'hui

Novartis) est composé par des protéines E1 et E2 recombinantes de génotype 1a. Ce vaccin est capable d'induire la production d'anticorps neutralisants à large spectre et une forte réponse cellulaire T CD4+ anti HCV. Malgré ces résultats la capacité de ce vaccin à protéger efficacement contre une infection persistante n'est pas claire (Houghton, 2011 ; Walker & Grakoui, 2015). Le second vaccin développé par Okairos correspond à un vecteur viral recombinant codant les protéines non structurales NS3 à NS5B de génotype 1b. Ce vaccin n'induit pas la production d'anticorps neutralisants mais l'activation des lymphocytes T CD4+ et CD8+. Cependant, la réponse immunitaire adaptative induite s'est révélée faible avec un faible niveau d'expression des lymphocytes T CD8+ et l'inhibition des lymphocytes T CD4+ par le HCV (Folgori et al., 2006 ; Walker & Grakoui, 2015). Par ailleurs, la combinaison de ce vaccin et des glycoprotéines d'enveloppe a été récemment testée et a donné des résultats encourageants. En effet, ce protocole a conduit à l'activation d'une réponse humorale et cellulaire qui se sont révélées être toutes deux nécessaires pour l'élimination du virus dans des cas d'infection chronique (Chmielewska et al., 2014 ; Raghuraman et al., 2012).

Le développement d'un vaccin prophylactique permettant de prévenir la réinfection des patients traités par les DAAs semble être l'objectif le plus utile et accessible. Cependant une des difficultés à surmonter est la restauration de l'immunité chez les patients ayant résolu l'infection après traitement (Walker & Grakoui, 2015).

Un tableau représentant les essais cliniques actuels pour le développement d'un vaccin prophylactique contre le HCV est présenté ci-dessous (tableau 2). Les vaccins sont classés en deux catégories selon la protéine utilisée et le type de la réponse immunitaire activée.

Tableau 2. Essais cliniques pour le développement d'un vaccin contre le HCV. Les vaccins sont classés en humorale (cellule B) s'ils contiennent les protéines E1, E2 et E1E2 ou L'ADN codant pour ces protéines et en cellulaire (cellule T) s'ils ne contiennent pas ni la protéine E1 ni E2 (Adapté de Dunlop et al., 2015).

Type of immune response targeted ^a	Sponsor	Vaccine formulation	Stage of development	Year
Humoral (B-cell)	Chiron/Novartis	rE1E2/MF59	Chimpanzee (n=7)	1994
	Chiron/Novartis	rE1E2/MF59	Human being (n=60)	2010
	Fujirebio Europe	rE1/Alum (T2S-918/InnoVac-C)	Human beings (n=20)	2004
	BPRC	rE1/Alum or rE2/Alum	Chimpanzee (n=4)	2011
Cellular (T-cell)	Intercell AG	IC41 (core, NS3, NS4 peptides)/poly-L-arginine	Human being (n=60)	2008
	Intercell AG	IC41 (core, NS3, NS4 peptides)/poly-L-arginine	Human being (n=54)	2010
	CSL Ltd/Novartis	Core/ISCOMATRIX	Human being (n=30)	2009
	Okairos Co	Ad6/Ad24+ electroporated DNA	Chimpanzee (n=4)	2006
	Okairos Co	Ad6/ChAd32	Rhesus macaque (n=3)	2006
	University of Oxford/Okairos Co	Ad6/ChAd3 (NS3, NS4, NS5)	Human being (n=30)	2012
	NIAID	ChAd3/MVA	Human being (Phase I, n=68; Phase II, n=382)	2016
	NIH/Okairos Co	Ad/DNA	Chimpanzee (n=5)	2012
Humoral and cellular (B- and T-cell)	Transgene	DNA encoding E1, E2, and NS3 plus MVA encoding E1, E2, and NS3	Chimpanzee (n=4)	2007
	NIH	VLP (core, E1, E2)/AS01B	Chimpanzee (n=4)	2007
	NYC Blood Center	Recombinant vaccinia encoding E1, E2, P7, NS2, and NS3	Chimpanzee (n=4)	2008

II. Le Virus de l'Hépatite C

II.1. Classification et Distribution géographique

Le Virus de l'Hépatite C (HCV) appartient au genre Hepacivirus de la famille des *Flaviviridae* qui comprend également les genres des Flavivirus, Pestivirus et Pegivirus (figure 6) (Romero-Brey & Bartenschlager, 2014). Le virus est classé en sept génotypes (numérotés de 1 à 7) dont les séquences nucléotidiques diffèrent de 31 à 33% (Simmonds et al., 1993, 2004, 2013). De même, chaque génotype est divisé en plusieurs sous-types (notés a, b, c.) qui diffèrent les uns des autres de 20% à 25% (Simmonds, 2004). Cette variabilité génétique est due à l'absence d'activité correctrice chez le RdRp qui assure la réplication du HCV et à une production virale importante (environ 10^{12} nouveaux virions par jour) (Pawlotsky, 2003). Ces caractéristiques conduisent à l'accumulation d'erreurs de réplication. Un degré élevé de variabilité génétique du virus est également observé chez chaque individu infecté conduisant à l'apparition de quasi-espèces (Forns et al., 1999).

Les génotypes et sous-types du HCV se répartissent différemment dans le monde (figure 7). Par exemple, le génotype 1 est fortement représenté aux Etats-Unis, en Europe, en Australie et en Asie de l'Est. Le génotype 2 se retrouve surtout en Afrique de l'ouest. Le génotype 3 se trouve en Asie du Sud/Sud-Est, tandis que le génotype 4 est très répandu au Moyen-Orient, en Egypte et en Afrique centrale. Le génotype 5 est répandu en Afrique du Sud et le génotype 6 prédomine en Asie du Sud-Est (Simmonds et al., 2004). Récemment, le génotype 7 a été isolé au Canada chez un immigrant en provenance d'Afrique centrale (Murphy et al., 2007).

II.2. La particule virale

Le HCV est un petit virus enveloppé à ARN simple brin de polarité positive. Les particules virales présentent des densités et des tailles hétérogènes (diamètres entre 30 et 100 nm ; densité de 1,03 à 1,20 g/cm³) (Andre et al., 2002 ; De Vos et al., 2002 ; Falcon et al., 2003, 2017). De plus, l'infectiosité de ces particules est inversement proportionnelle à leur densité. Ces variations de densité sont dues à l'association des particules virales avec des lipoprotéines. Ainsi, différentes apolipoprotéines (comme ApoAI, ApoB, ApoC1 et ApoE) sont présentes à la surface de ces particules hybrides appelées lipoviroparticules (LVP). Les particules de plus faible densité ont une densité et une composition en lipide et cholestérol similaires à celle des VLDL (pour Very Low Density Lipoprotein) et LDL (pour Low Density Lipoprotein) avec une forte proportion d'ester de cholestérol (Andre et al., 2002 ; Gastaminza et al., 2010 ; Nielsen et al., 2006 ; Thomssen et al., 1992, 1993). Des données suggèrent que la densité des particules est dépendante du type cellulaire produisant le virus (Calattini et al., 2015 ; Lindenbach et al., 2006 ; Podevin et al., 2010). L'enveloppe virale est formée d'une bicouche lipidique dans laquelle sont enchassées les protéines d'enveloppe E1 et E2 et les apolipoprotéines (figure 8). Sous la bicouche lipidique, la nucléocapside formée par la protéine core renferme l'ARN génomique simple brin. Récemment, une approche d'immunocapture spécifique des particules du HCV a permis la visualisation de particules intactes par microscopie électronique à transmission directe (Piver et al., 2016). Les particules visualisées présentent un disque central correspondant à la capsidite entouré d'un anneau irrégulier et d'un croissant sensible aux détergents constituant les lipides associés au virus. Comme mentionné précédemment, cette architecture particulière peut potentiellement affecter l'accessibilité des protéines d'enveloppe aux anticorps neutralisants. Ainsi, l'interaction du virus avec les lipoprotéines permet de protéger le virus de la réponse immunitaire de l'hôte.

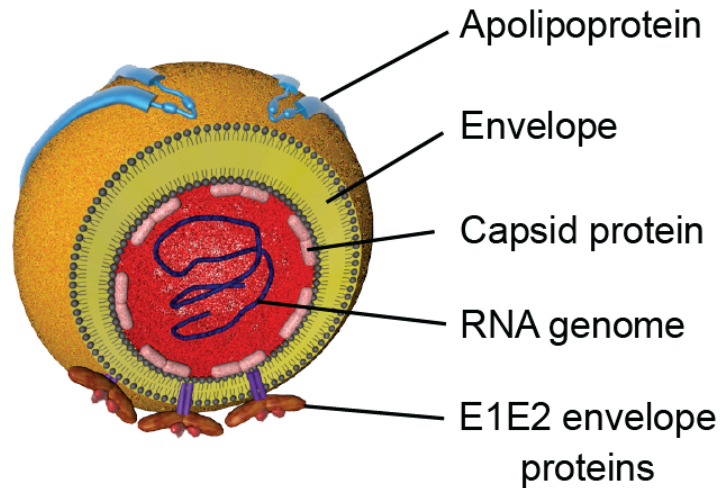


Figure 8. La particule virale du HCV. Les particules virales sont constituées d'une nucléocapside contenant l'ARN viral entouré par une enveloppe lipidique dérivée de la cellule hôte dans laquelle les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 sont insérées (D'après Fénéant et al., 2014).

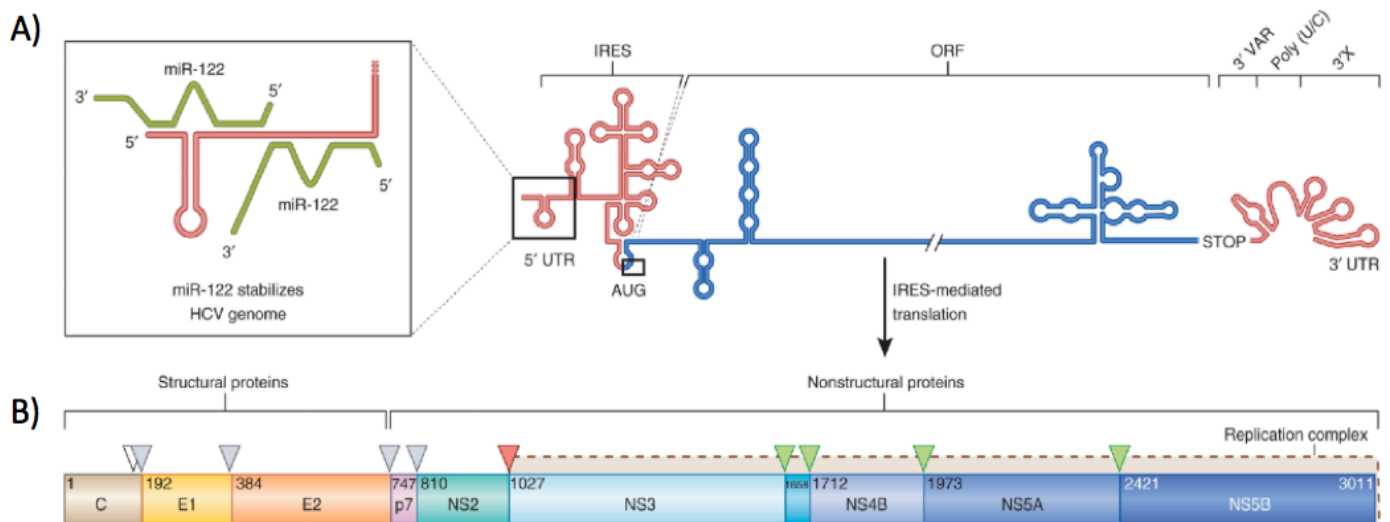
II.3. Le génome viral

Le génome du HCV est un ARN monocaténaire de polarité positive de 9,6 kb, contenant deux régions 5' et 3' non codantes (UTR : Untranslated Regions) et un cadre de lecture (ORF : Open Reading Frame), codant pour une polyprotéine précurseur de ~ 3000 acides aminés (Choo et al., 1991) (figure 9-A). Cette polyprotéine est clivée de manière co- et post-traductionnelle par des protéases cellulaires et virales, ce qui aboutit à la libération de 3 protéines structurales (Core, E1 et E2) et 7 protéines non structurales (P7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B) (Moradpour et al., 2007; Bartenschlager et al., 2013) (Figure 9-B). Les protéines structurales du HCV sont les composants protéiques de la particule virale et sont essentielles pour l'infectiosité du virus. Les protéines non structurales (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B) sont indispensables pour la réplication du génome viral et l'assemblage des virions (Moradpour et al., 2007 ; Bartenschlager et al., 2013).

La région 5'UTR du HCV est la plus conservée dans le génome du HCV. Elle se situe en amont de l'ORF et contient de 341 à 344 nucléotides (nts) qui forment 4 domaines secondaires (I à IV). Les domaines II, III et IV ainsi que les 42 premiers nucléotides de la région codante de la protéine core, constituent l'IRES (pour Internal Ribosomal Entry Site) (figure 9-A). L'IRES du HCV a la capacité de recruter la sous-unité ribosomale 40S sans le concours des facteurs canoniques d'initiation de la traduction. Ainsi, cette région contient tous les éléments nécessaires à l'initiation de la traduction de l'ARN viral (Honda et al., 1996). De plus, le

domaine III interagit avec le eIF3 (pour eukaryotic Initiation Factor 3) qui déclenche la traduction de l'ARN viral (Kieft et al., 2002). Entre les domaines I et II se trouvent 2 séquences cibles du microARN miR-122. Ce micro ARN cellulaire est nécessaire à la stabilisation de l'ARN viral et à la régulation de la réplication (Jopling, 2008)

La région 3'UTR contient environ 225 nt. Elle est divisée en trois régions principales, une région variable d'environ 40 nts, une longue chaîne polypyrimidine (polyU/UC), et une région avec 98 nt très conservés qui forme le domaine 3' terminal (3'X) à la fin du brin d'ARN. Ces régions contribuent à amplifier la réplication (Kolykhalov et al., 2000). De plus, une partie de la chaîne polyU/UC et du domaine 3'X, sont essentielles à la réplication virale en interagissant avec la protéine NS5B (Yi & Lemon, 2003; Murayama et al., 2010). Ainsi, la deuxième boucle du domaine 3'X joue un rôle dans l'initiation de la synthèse du brin d'ARN négatif lors de la réplication (Friebe et al., 2005).



II.4. Les protéines virales

II.4.a. Les protéines structurales

II.4.a.i. La protéine core

La protéine core se trouve à l'extrémité N-terminale de la polyprotéine (Figure 9-B). Cette protéine présente un peptide signal dans sa région C-terminale qui adresse la protéine au réticulum endoplasmique. Cette séquence est ensuite clivée par une peptidase signal du réticulum endoplasmique. La protéine immature est composée de 191 acides aminés (figure 10) et elle subit ensuite une maturation par une peptidase de peptide signal (Hijikita et al., 1991 ; McLauchlan, 2002). Seule la protéine core mature conduit à la production de particules virales infectieuses (Targett-Adams et al., 2008b). Ces protéines s'oligomérisent et s'associent avec le génome viral pour former la nucléocapside du virus (Kao et al., 2016 ; Moradpour & Penin, 2013). La protéine core mature est dimérique et associée à la membrane. Elle comporte deux domaines et plusieurs ponts disulfures qui ont pour rôle de stabiliser sa structure (figure 10). Le domaine hydrophile N-terminal (D1 :1 à 117 a.a.) contient des résidus basiques nécessaires à la formation de la nucléocapside (Klein et al., 2005). Il interagit avec l'extrémité 5' de l'ARN génomique viral et permet son encapsidation (Nakai K et al., 2006). D'autre part, ce domaine peu structuré interagit avec plusieurs facteurs cellulaires et viraux (Roohvand et al., 2009).

Le domaine hydrophobe C-terminal (D2), de 118 à 174 a.a., est responsable de l'association de la protéine core aux gouttelettes lipidiques (GLs), aux mitochondries et au RE (McLauchlan et al., 2002; McLauchlan, 2009, Rouillé et al., 2006 ; Scwer et al., 2004). La liaison de la protéine core aux GLs est essentielle à la production des particules virales (Boulant et al., 2007, Lyn et al., 2013). Sa localisation à la surface des GL semble également contribuer à la stéatose, caractérisée par l'accumulation de triglycérides sous forme de GL dans les hépatocytes infectés par le HCV (Moriya et al., 1997). Cette stéatose survient très fréquemment chez les patients infectés par le génotype 3 (Kumar et al., 2002 ; Poynard et al., 2003 ; Patton et al., 2004). Une étude récente a montré que l'expression *in vitro* de la protéine core du génotype 3 conduit à la formation de GLs volumineuses dans les hépatocytes (Clement et al., 2011). Enfin, la protéine core est capable d'activer ou d'inactiver plusieurs gènes engagés dans la croissance cellulaire (Fukutomi et al., 2005) ou l'apoptose (Nguyen et al., 2006).

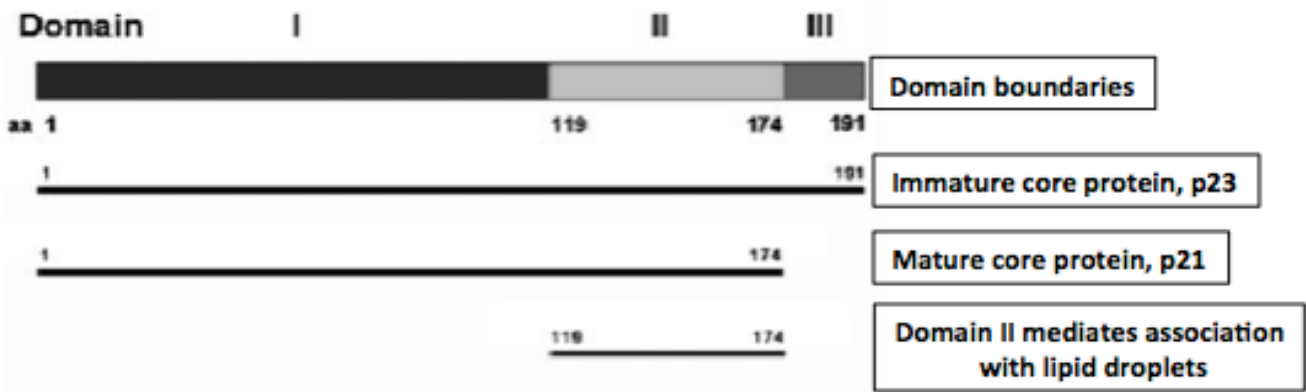


Figure 10. Représentation schématique de la protéine core du HCV. La protéine core est sécrétée sous forme d'une protéine immature, p23 avec trois domaines, avant d'être clivée en une protéine mature, p21 contenant deux domaines). Le domaine I est responsable de l'interaction avec l'ARN viral alors que le domaine DII interagit avec les GL et le RE (Adapté de Williamson & Colberg-Poley, 2009).

II.4.a.ii. La protéine ARFP

La protéine ARFP (pour Alternative Reading Frame Protein), encore nommée protéine F, est le résultat d'un décalage du cadre de lecture au niveau des 11 premiers résidus de la protéine core, lors de la traduction (Branch et al., 2005) (figure 11). Cette protéine est composée de ~ 160 a.a. avec une taille de 17 kDa (Boulant et al., 2003). Des anticorps anti-ARFP ainsi qu'une réponse immunitaire cellulaire ont été détectés chez des patients infectés par le HCV (Karamitros et al., 2012 ; Walewski et al., 2001). Le rôle exact de cette protéine reste inconnu, mais certaines études ont montré que ARF pourrait avoir un rôle dans la réplication du virus (McMullan et al., 2007), dans la régulation du système immunitaire et dans la pathogénèse (Fiorucci et al., 2007).

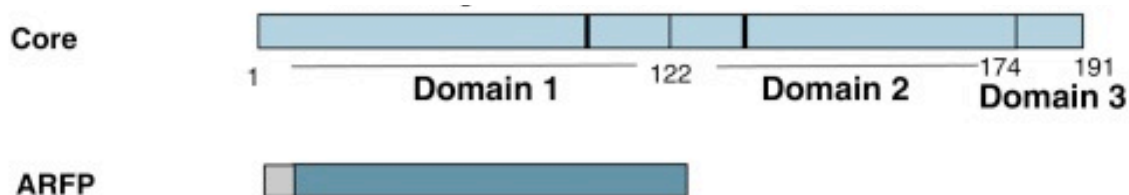


Figure 11. Représentation schématique de la protéine ARFP du HCV. La protéine ARFP est une petite protéine, synthétisée par un décalage de cadre de lecture de la séquence codant la protéine core (D'après Kao et al., 2016).

II.4.a.iii. Les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2

La description des glycoprotéines E1E2 fait l'objet de la partie V de l'introduction.

II.4.b. Les protéines non structurales

II.4.b.i. La protéine p7

La protéine p7 est une protéine membranaire de 63 résidus. Elle est générée par clivage de la polyprotéine précurseur par une peptidase signal d'origine cellulaire localisée dans la membrane du RE. Elle comporte deux régions transmembranaires connectées par une boucle cytoplasmique avec les régions N- et C- terminales orientées vers la lumière du RE (Carrère-Kremer et al., 2002) (Figure 12-A).

La protéine p7 appartient à la famille des viroporines et forme des canaux ioniques facilitant la production virale (Figure 12-B) (Nieva et al., 2012 ; Premkumar et al., 2004). p7 n'est pas essentielle pour la réplication de l'ARN viral (Bartenschlager & Lohmann, 2000). Cependant, elle joue un rôle essentiel dans l'assemblage et la sécrétion des particules virales infectieuses (Sakai et al., 2003 ; Jones et al., 2007 ; Steinmann et al., 2007). Ainsi, l'absence de p7 conduit à l'accumulation d'intermédiaires de capsid ayant partiellement incorporé l'ARN viral (Gentsch et al., 2013). Par ailleurs, il semble que p7 protège la glycoprotéine d'enveloppe E2 d'une dégradation prématurée par le protéasome lors de l'assemblage. En interagissant avec E1E2 et NS2, p7 joue un rôle clé dans la coordination de l'assemblage des particules virales (Madan & Bartenschlager, 2015). Le rôle joué par le canal ionique formé par p7 lors de l'infection pourrait prévenir l'acidification des organelles cellulaires lors de la sécrétion des virions (Atkins et al., 2014 ; Wozniak et al., 2010).

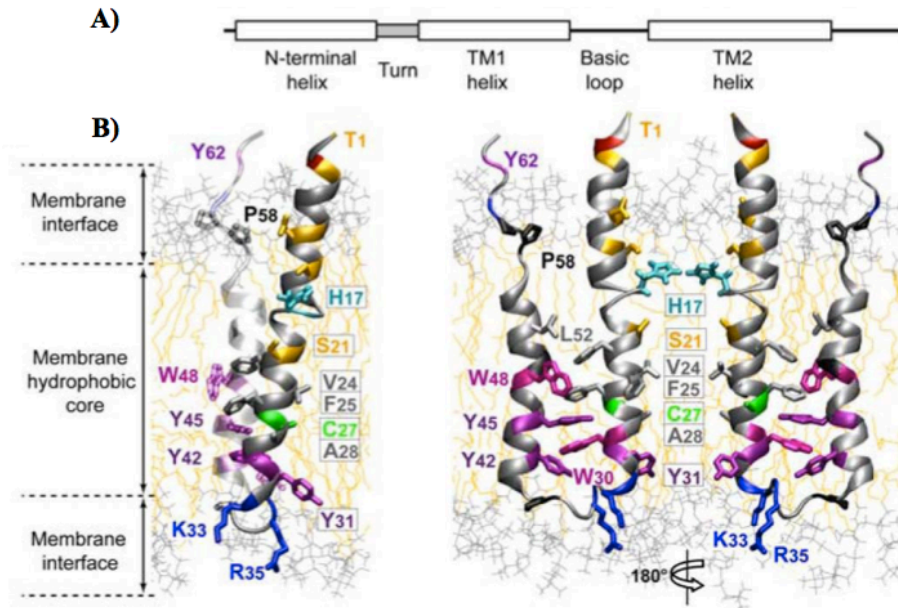


Figure 12. La protéine p7. A) la structure de la protéine p7. La protéine p7 comprend une région N-terminale et deux domaines transmembranaires en hélice α . B) Formation du viropore par oligomérisation de la protéine p7 (Steinmann & Pietschmann, 2010).

II.4.b.ii. La protéine NS2

NS2 est une protéine transmembranaire de 23 kDa, localisée dans le RE. Dans la séquence de la polyprotéine virale, NS2 est située entre p7 et NS3 (figure 13). La jonction p7/NS2 est clivée par une peptidase signal du RE, la jonction NS2/NS3 est clivée par l'activité protéase de NS2. La région N-terminale de NS2 présente 3 segments transmembranaires (Jirasko et al., 2010). Sa région C-terminale est responsable de son activité protéasique (Lorenz et al., 2006). NS2 n'est pas directement nécessaire à la réplication de l'ARN du HCV, mais cette cystéine à protéase est nécessaire à la maturation de NS3 (Hijikata et al., 1993), qui est elle-même cruciale pour la réplication (Hijikata et al., 1993 ; Lackner et al., 2004 ; Welbourn et al., 2005).

Ainsi, les mutations dans le site actif de NS2 affectent la réplication de l'ARN (Jones et al., 2007). Plusieurs études suggèrent que NS2 joue un rôle important dans la production de particules virales infectieuses. Cette protéine favorise la formation d'un réseau d'interactions entre les protéines structurales et non structurales du HCV (E1, E2, p7, NS3 et NS5A) permettant l'assemblage du virus (Popescu et al., 2011 ; Yi et al., 2007, 2009)

De plus, des mutations dans la région C-terminale de NS2 ont montré que cette protéine intervient lors de l'étape de maturation qui est nécessaire pour convertir le virion assemblé non infectieux en une particule virale infectieuse (Yi et al., 2009).

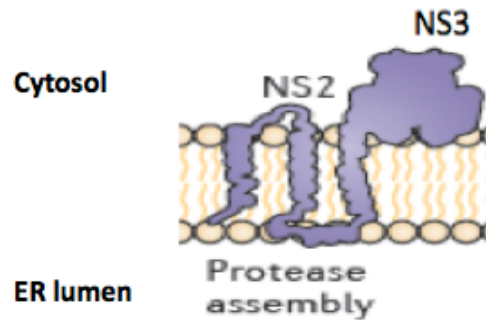


Figure 13. Représentation schématique de la protéase NS2/NS3 au niveau du RE. Le complexe NS2/NS3 est responsable du clivage entre les deux protéines NS2 et NS3 (Adapté de Bartenschlager et al., 2013).

II.4.b.iii. Les protéines NS3 et NS4A

Les protéines NS3 et NS4A forment un complexe non covalent. NS3 est une protéine multifonctionnelle de 67 kDa, Sa région N terminale présente une activité sérine-protéase, son extrémité C-terminale possède une activité hélicase/ NTPase (pour Nucléoside Triphosphatase) (Gallinari et al., 1998) (figure 14). La protéine de 8 kDa NS4A est ancrée dans la membrane du RE via son domaine transmembranaire N-terminal et permet ainsi l'ancrage de NS3 à la membrane du RE. NS4A constitue le cofacteur de la protéase NS3 et est responsable de son activation (Failla et al., 1994 ; Lindenbach et al., 2007). Durant l'étape de maturation de la polyprotéine du HCV, NS3/4A clive respectivement les jonctions NS3-NS4A, NS4A-NS4B, NS4B-NS5A et NS5A-NS5B, générant ainsi les protéines virales non structurales du virus (Bartenschlager et al., 1995). NS3/4A a également la capacité de cliver certains facteurs cellulaires et de les inactiver (Sumpter et al., 2005). Ainsi, NS3/4A clive les protéines clé de la réponse immunitaire innée, MAVS et TRIF. Cette inactivation conduit à l'inhibition de la réponse immunitaire innée induite par les senseurs RIG-I et TLR3 (Chen et al., 2007 ; Li et al., 2005).

L'activité hélicase/NTPase de NS3 est nécessaire à la réplication virale. Elle permet le dépliement des structures secondaire d'ARN au moment de l'initiation de la réplication et la dissociation des dimères d'ARN assistant ainsi la polymérase NS5B. Il semble que l'activité NTPase fournisse l'énergie nécessaire au fonctionnement de l'hélicase (Lindenbach et al. 2007 ; Pang et al., 2002).

Ces propriétés font du complexe NS3/NS4A une cible d'intérêt pour les antiviraux DAA (Li et al., 2005).

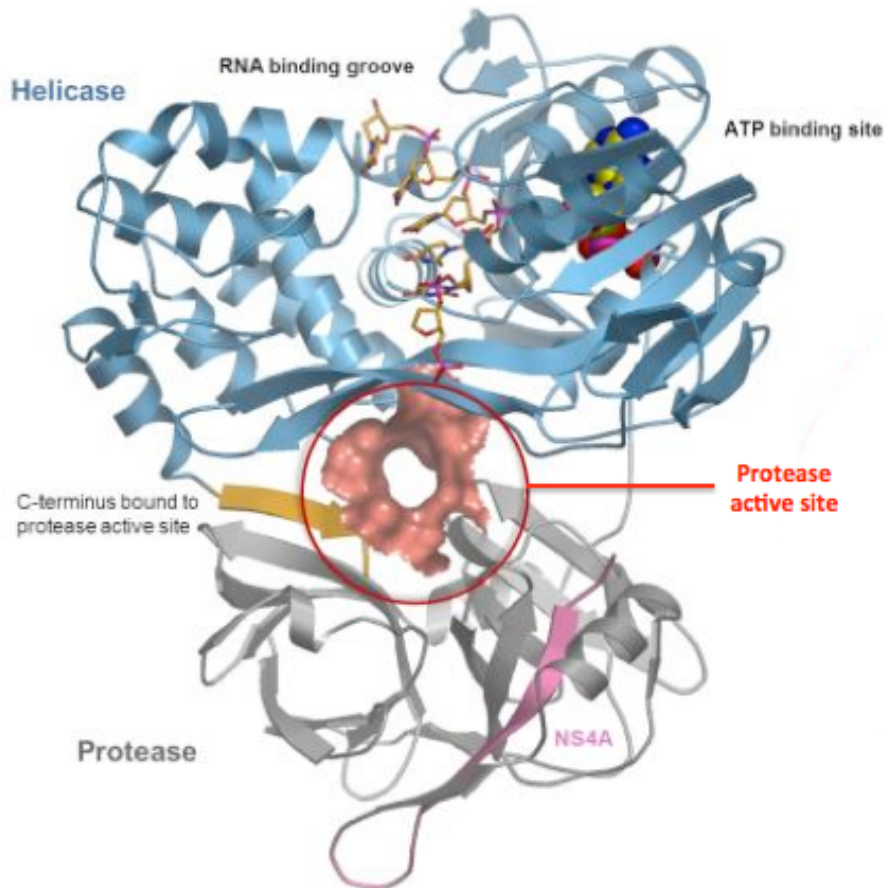


Figure 14. Structure cristallographique de la protéase/hélicase NS3/4A. Le domaine protéase est présenté en gris, le domaine hélicase en bleu et la protéine NS4A est montrée en rose (D'après Saalau-Bethell et al., 2012).

II.4.b.iv. La protéine NS4B

NS4B est une protéine hydrophobe de 27 kDa, intégrée dans la membrane du RE. NS4B possède quatre domaines transmembranaires et des extrémités N- et C-terminales cytoplasmiques (Lundin et al., 2003) (Figure 15). Des études suggèrent que la topologie membranaire de la région N-terminale de NS4B est dynamique et peut être modulée par des interactions entre protéines du complexe de réplication du HCV (Gouttenoire et al., 2009 ; Lundin et al., 2006).

NS4B induit une altération des membranes du RE aboutissant à la formation du « membranous web ». Ces invaginations membranaires permettent la concentration de complexes de réplication dans la cellule, constituant ainsi une plateforme pour la réplication virale (Egger et al., 2002 ; Gosert et al., 2003). La capacité de NS4B à s'oligomériser est importante pour la mise en place de la machinerie de réplication virale (Gouttenoire et al., 2010). La palmitoylation de sa portion C terminale semble également être nécessaire à la

formation des complexes de réplication. Le rôle joué par NS4B lors de la réplication virale est dépendant de sa capacité à lier le GTP (pour Guanosine Triphosphate) (Thompson et al., 2009).

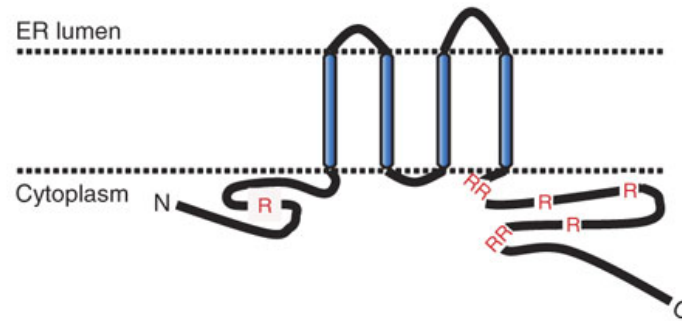


Figure 15. Représentation schématique des domaines transmembranaires et intracellulaires de NS4B. La protéine NS4B comporte 4 domaines transmembranaires avec des régions N- et C-terminales cytoplasmiques. Les acides aminés conservés sont présentés en rouge (D'après Einav et al., 2008).

II.4.b.v. La protéine NS5A

NS5A est une phosphoprotéine de 447 aa associée à la membrane par son extrémité N-terminale. Elle est organisée en 3 domaines fonctionnels (figure 16). Les domaines 1 et 2 sont principalement impliqués dans la réplication de l'ARN viral, le domaine 3 est essentiel pour l'assemblage de la particule virale (Appel et al., 2008 ; Kim et al., 2011 ; Tellinghuisen et al., 2008). De plus le domaine 1 permet l'interaction de NS5A avec les gouttelettes lipidiques et le domaine 2 est responsable de son interaction avec Core. L'organisation des domaines D2 et D3 permet de générer une structure flexible facilitant l'interaction de NS5A avec des protéines virales ou cellulaires. Ainsi, ces domaines interagissent avec la cyclophilin A et la PI4KIII α qui sont des facteurs cellulaires essentiels à la réplication du HCV (Berger et al., 2011 ; Kaul et al., 2009 ; Lim & Hwang, 2011). Le domaine 1 de NS5A forme des dimères capables de lier l'ARN. Ces données laissent supposer que des dimères de NS5A forment des voies le long des membranes intracellulaires, permettant la circulation de l'ARN viral et coordonnant les différentes étapes de réplication (Moradpour et al., 2005).

NS5A peut présenter deux niveaux de phosphorylation distincts : un niveau basal (56 kDa) et un niveau d'hyperphosphorylation (58 kDa). Plusieurs résultats suggèrent que le niveau de phosphorylation de NS5A module la réplication de l'ARN viral en influençant les interactions

de la protéine avec les facteurs cellulaires impliqués dans la réplication et l'assemblage. Différentes kinases cellulaires participent à la phosphorylation de la protéine (Appel et al., 2005 ; Evans et al., 2004).

NS5A interagit avec NS5B et régule son activité polymérase. Plusieurs interactions avec des facteurs cellulaires impliqués dans la régulation de la transcription, de l'apoptose et du contrôle du cycle cellulaire ont été mises en évidence. Ainsi, l'interaction de NS5A avec p53 inhibe le déclenchement de l'apoptose par ce régulateur ce qui favorise la progression des carcinomes hépatocellulaires (Lan et al., 2002).

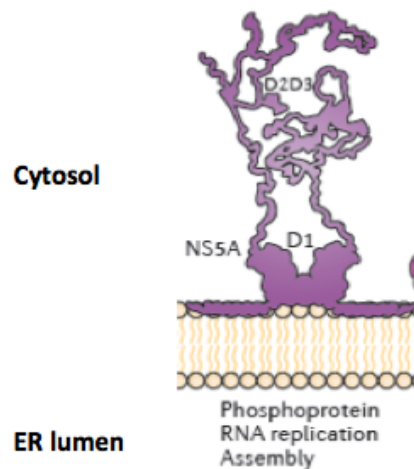


Figure 16. Organisation et la position de la protéine NS5A dans le RE. NS5A comporte trois domaines fonctionnels D1, D2 et D3. D1 et D2 sont indispensables pour la réplication de l'ARN viral alors que D3 est impliqué dans l'assemblage de la particule virale (Adapté de Bartenschlager et al., 2013).

II.4.b.vi. La protéine NS5B

NS5B est une protéine de 68 kDa (591 a.a.) ancrée dans la membrane du RE par son domaine transmembranaire (21 a.a.) C-terminal (figure 17). NS5B constitue le RdRp du HCV qui assure la réplication du virus. Pour cela cette enzyme synthétise dans un premier temps l'ARN négatif complémentaire de l'ARN génomique viral, suivi par la synthèse de l'ARN positif à partir de l'ARN négatif néo-synthétisé (Zhong et al., 2000a, 2000b). Le domaine catalytique de NS5B correspond aux 530 résidus N-terminaux qui présentent l'organisation en trois sous domaines et les motifs communs aux RdRps. Ces trois sous domaines ont une organisation spatiale en forme de main droite, chacun d'entre eux correspondant respectivement aux doigts, à la paume et au pouce. Ces motifs incluent la séquence GDD dans le site actif. Le site catalytique est situé dans le domaine « paume ». L'ARN simple brin se

glisse dans le passage entre les « doigts » et le « pouce » qui conduit directement vers le site actif. Les nucléotides atteignent le site actif par un second tunnel.

L'ancrage de NS5B à la membrane n'est pas nécessaire à son activité polymérase *in vitro* mais est indispensable à la réplication du virus dans les cellules (Moradpour et al., 2004). La modélisation moléculaire de NS5B suggère que la région permettant de lier l'ARN est inaccessible lorsque la protéine est associée à la membrane, rendant la protéine inactive. Cette forme inactive de la protéine peut être activée par un changement conformationnel du linker de 40 a.a. qui connecte le site catalytique au segment transmembranaire C-terminal.

Par ailleurs, le mécanisme de fonctionnement de NS5B ne permet pas la correction des erreurs génétiques introduites en cours de synthèse, ce qui rend l'apparition de mutations très fréquente lors de la réplication.

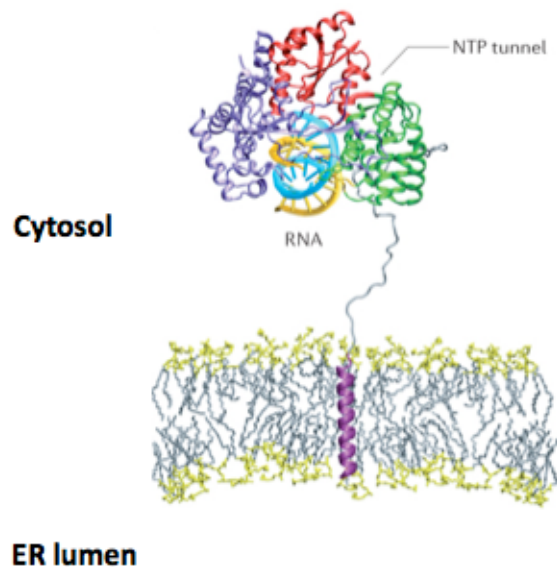


Figure 17. Structure cristallographique de la protéine NS5B au niveau de la membrane du RE. Le domaine catalytique cytosolique de la protéine NS5B est associé à la membrane du RE par son domaine C-terminal (Adapté à partir de Bartenschlager et al., 2013).

III. Modèles et systèmes pour l'étude du HCV

III.1. Les systèmes de culture *in vitro*

Après l'identification du virus de l'hépatite non-A non-B en 1975 (Feinstone et al., 1975), les différentes tentatives d'amplifier du virus en culture cellulaire à partir de plasma ou sérum se sont montrées infructueuses. L'identification du génome du HCV en 1989 (Choo et al., 1989) n'a pas non plus permis de résoudre les difficultés rencontrées pour propager ce virus *in vitro*. Les approches basées sur la biologie moléculaire ont cependant permis de développer des modèles alternatifs pour étudier certaines étapes du cycle infectieux du HCV et elles ont progressivement aidé à la mise au point d'un système de culture cellulaire efficace. Le développement de différents modèles pour l'étude du HCV est présenté ci-dessous :

III.1.a. Les systèmes réplicons du HCV

L'identification du génome du HCV a permis de reconstituer l'ADNc de ce virus avec l'idée de construire un clone infectieux dont le transcrit produit *in vitro* devait permettre de produire du virus après transfection cellulaire. La mise au point d'un tel outil a cependant pris du temps car les séquences génomiques disponibles n'étaient pas complètes. Il a en effet fallu attendre 1996 pour identifier la partie manquante de l'extrémité 3' non codante du virus (Kolykhalov et al., 1996). La reconstitution du génome complet du HCV a ensuite permis de construire un clone infectieux qui a pu être validé *in vivo* par injection intra-hépatique du génome viral chez le chimpanzé (Kolykhalov et al., 1997 ; Yanagi et al., 1997). Ces travaux ont permis pour la première fois de valider la fonctionnalité d'une séquence génomique virale produite *in vitro*. Cependant, le même génome viral transfecté dans des cellules hépatocytaires n'a pas permis de produire du virus *in vitro*. Pour pallier cette difficulté, l'idée a été de se concentrer sur la partie répllicative du génome viral en éliminant les séquences des protéines de structure afin de produire un système « réplicon » ou unité minimale de répllication génomique (figure 18). Ce type d'approche est basé sur des modèles similaires développés pour d'autres virus à ARN brin positif. C'est en 1999 qu'un premier modèle a été mis au point après la construction d'une séquence consensus de la souche Con1 de génotype 1b (Lohmann et al., 1999). Le système réplicon, dans lequel l'ARN subgénomique du HCV se réplique efficacement dans des lignées cellulaires d'hépatome humain, a constitué une étape essentielle dans les études de la répllication de l'ARN du HCV (Lohmann et al., 1999). Ce premier modèle était composé d'une séquence virale subgénomique constituée des régions

5'UTR, NS3-NS5B et 3'UTR de la souche Con1, du génotype 1b, introduite dans une construction bicistronique contenant un gène de résistance à la néomycine (Lohmann et al., 1999) (Figure 18). La capacité répliquative de ce réplicon a ensuite été améliorée par des mutations adaptatives de l'ARN du HCV ou par l'identification de clones cellulaires montrant une permissivité accrue à la réplication virale tels que les cellules Huh-7.5 (Blight et al., 2000, 2002 ; Lohmann et al., 2001, 2003). L'amélioration de la réplication observée dans les cellules Huh7.5 semble être le résultat d'un défaut dans la voie de signalisation de l'IFN qui joue un rôle important dans l'immunité antivirale. Par la suite, des réplicons d'autres souches du génotype 1 (Blight et al., 2003 ; Grobler et al., 2003 ; Ikeda et al., 2002 ; Yi & Lemon, 2004) ainsi que d'autres génotypes (Kato et al., 2003 ; Kinge et al., 2014 ; Peng et al., 2013 ; Saeed et al., 2012 ; Yu et al., 2014) ont été obtenus. Il est à noter qu'à l'exception de la souche JFH1, tous ces réplicons présentaient des mutations adaptatives. Sur la base de ces réplicons, l'idée était ensuite de réinsérer la séquence de la région des protéines de structure afin de reconstituer un système répliquatif de longueur génomique (Pietschmann et al., 2002). Malheureusement, ces réplicons génomiques se sont révélés défectueux pour la production de virus infectieux aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (Bukh et al., 2002). La raison de cet échec vient du fait que pour le HCV, comme pour les autres membres de la famille des *Flaviviridae*, les protéines non-structurales sont impliquées dans le mécanisme d'assemblage de la particule virale (Murray et al., 2008). En effet, après le développement d'un clone infectieux validé *in vitro*, il a été montré que les mutations permettant une réplication efficaces des réplicons conduisaient à un défaut d'assemblage viral en culture cellulaire (Pietschmann et al., 2009). Les difficultés de développement d'un système de culture cellulaire pour le HCV sont également en partie dues à la mise en place de la réponse immunitaire innée. Il a cependant été postulé que des facteurs pro-viraux pouvaient être absents des cellules Huh-7 couramment utilisées pour étudier ce virus. Dans ce contexte, une étude récente a montré que les cellules d'un hépatome Huh-7 n'expriment pas un facteur cellulaire, le SEC14L2, qui permet la réplication des différents génotypes du HCV en l'absence de mutations adaptatives dans le génome viral (Saeed et al., 2015).

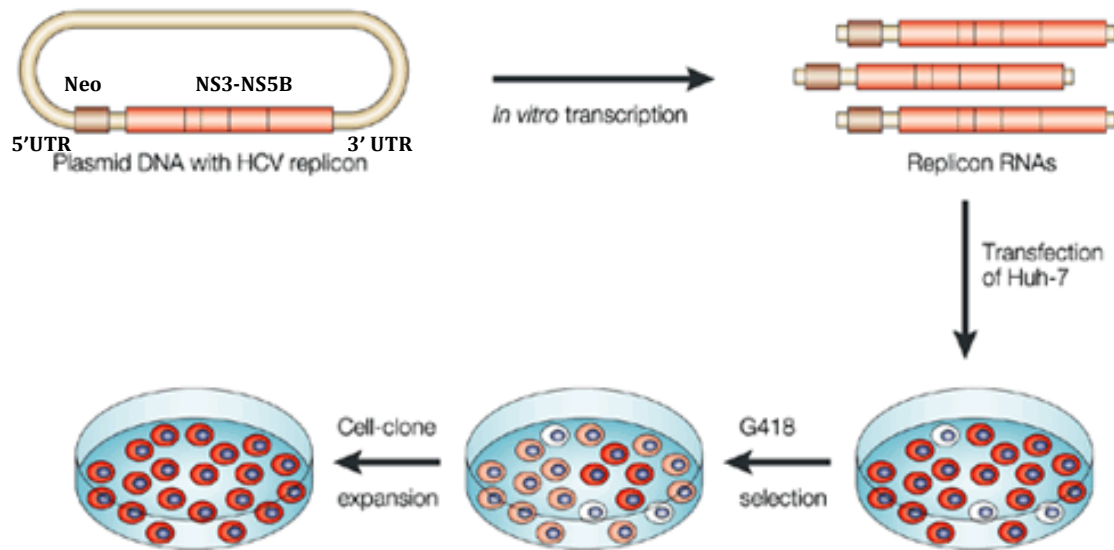


Figure 18. Principe de la génération du système réplicon du HCV. La séquence subgénomique contenant les régions 5'UTR, NS3-NS5B et 3'UTR de la souche Con1 du génotype 1b du HCV est insérée dans une construction plasmidique bicistronique contenant un gène de résistance à la néomycine. L'ARN transcrit de ce plasmide est transfecté dans des cellules d'hépatome humain. Les cellules possédant un ARN répliatif sont ensuite sélectionnées par traitement à la néomycine. La réplication de l'ARN dans ces cellules est ensuite obtenue par l'apparition de mutations adaptatives. Neo : Néomycine. (Adapté à partir de Bartenschlager, 2002).

III.1.b. le système HCVpp

En parallèles de la mise au point de systèmes permettant l'étude de la réplication génomique, d'autres équipes s'intéressant à l'entrée virale ont essayé de mettre au point des outils permettant d'étudier les étapes précoces du cycle infectieux du HCV. Une première approche simple a consisté à produire une forme sécrétée de la glycoprotéine E2 afin d'identifier un récepteur potentiel pour ce virus. Cette approche très réductionniste est loin de mimer la structure de la particule virale. Elle a cependant été essentielle pour l'identification de deux co-récepteurs du HCV : la tétraspanine CD81 et le SR-BI (pour Scavenger Receptor class B member 1) (Pileri et al., 1998 ; Scarselli et al., 2002). D'autres approches plus élaborées ont consisté à produire des particules virales chimériques entre un autre virus enveloppé et les protéines d'enveloppe du HCV. Différents modèles ont été testés mais seuls des systèmes rétroviraux ou lentiviraux pseudotypés avec des protéines d'enveloppe du HCV ont permis de produire des outils fonctionnels. Ces virus chimériques aussi appelés pseudo-particules de HCV (HCVpp) ont permis pour la première fois d'étudier le rôle des protéines d'enveloppe du HCV dans l'entrée virale (Bartosch et al., 2003c ; Drummer et al., 2003 ; Hsu et al., 2003). Les HCVpp sont des particules virales recombinantes constituées par des protéines core

provenant de retrovirus ou lentivirus entourées par une enveloppe dans laquelle les glycoprotéines d'enveloppe du HCV sont incorporées et exprimées sur la surface. Les HCVpp sont générées par transfection des cellules HEK-293T avec trois plasmides différents (figure 19): une construction exprimant les glycoprotéines E1E2 du HCV, une construction de provirus exprimant un gène rapporteur tel que la Luciferase (Luc) ou la protéine GFP et une construction codant les protéines gag-pol de HIV (pour Virus d'Immunodéficience Humaine) ou du MLV (pour Murine Leukemia Virus) (Bartosch et al., 2003c ; Hsu et al., 2003). Les particules virales sécrétées dans le surnageant sont recueillies et, après purification, elles sont utilisées pour infecter des cellules natives telles que les cellules Huh-7 ou Huh-7.5. L'infectiosité est ensuite mesurée par quantification de l'activité du gène rapporteur. C'est avec ce système qu'il a été démontré que l'étape d'entrée est médiée par les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 du HCV. Il a ainsi été montré que l'infection de cellules d'hépatome par les HCVpp pouvait être neutralisée par des anticorps anti-E1, anti-E2 et anti-CD81 ou bien par des sérums provenant de patients infectés par le HCV (Bartosch et al., 2003a). De plus, Ils ont montré que l'étape d'entrée des HCVpp est un processus dépendant du pH (Hsu et al. 2003). Par conséquent, le système HCVpp a été largement utilisé pour étudier le processus d'entrée du HCV et pour identifier les facteurs d'entrée cellulaire et l'étape de fusion entre la membrane virale et la membrane endosomale. Un certain nombre de facteurs cellulaires ont ainsi été identifiés ou confirmés en utilisant ce système (Ploss & Evans, 2012). Ce système a également été utilisé pour tester l'efficacité d'anticorps neutralisants provenant de patients infectés par le HCV ou de chimpanzés infectés expérimentalement (Bartosch et al., 2003a ; Logvinoff, et al., 2004 ; Von Hahn et al., 2007). De façon intéressante, le système HCVpp offre la souplesse d'étudier facilement la fonction de protéines d'enveloppe de différents isolats du HCV et il permet également d'étudier le tropisme du virus (McKeating et al., 2004). Les HCVpp constituent également un bon modèle pour évaluer des traitements antiviraux ciblant l'entrée virale (Baldick et al., 2010).

Malgré tous ces avantages, les HCVpp présentent certaines limitations dans l'étude du HCV. Ces particules sont produites dans des cellules non hépatiques (cellules 293T), dans lesquelles la voie d'assemblage des VLDL est défectueuse et le système HCVpp ne peut donc pas être utilisé pour étudier le rôle des lipoprotéines dans l'entrée virale.

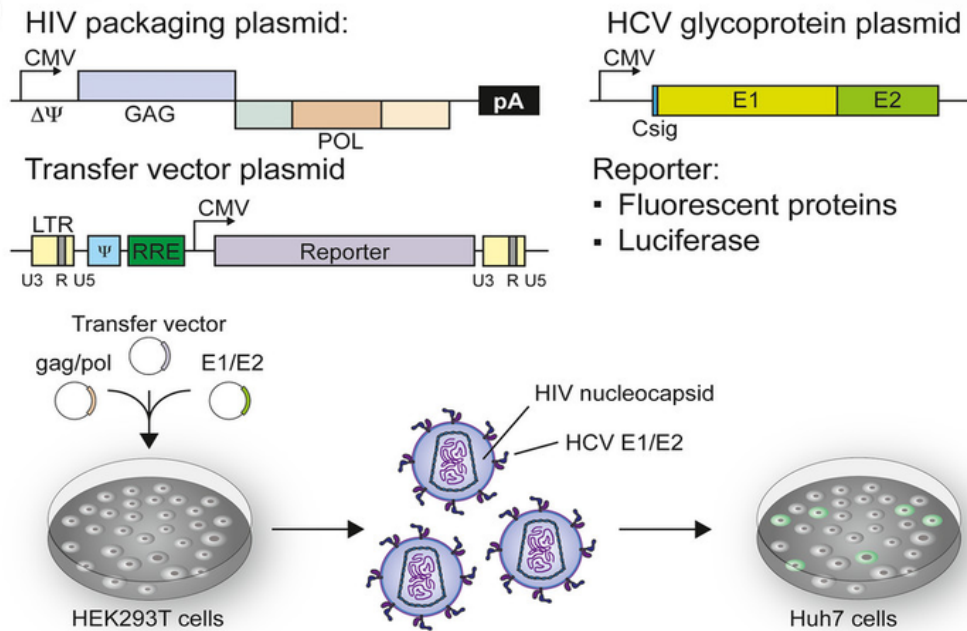


Figure 19. Représentation schématique du système HCVpp. Les particules du système HCVpp sont générées par transfection simultanée des cellules HEK293T avec 3 plasmides : un plasmide contient les séquences des protéines GAG/POL du HIV, un deuxième les glycoprotéines d’enveloppe du HCV et un troisième un gène rapporteur. Les particules obtenues sont ensuite utilisées pour étudier l’étape d’entrée du HCV (Adapté à partir d’Ortega-Prieto & Dorner, 2016).

III.1.c. Le système de culture cellulaire HCVcc

Comme discuté précédemment, les réplicons développés dans différents laboratoires présentaient des mutations adaptatives qui étaient incompatibles pour l’assemblage des particules virales (Pietschmann et al., 2009). Cela est dû au fait que les protéines non-structurales du HCV sont impliquées dans le mécanisme d’assemblage de la particule virale (Murray et al., 2008). Conscientes de ces limitations, différentes équipes ont cherché à identifier des réplicons ne nécessitant pas de mutations adaptatives pour se multiplier de façon efficace en culture cellulaire. La tâche a été difficile mais une exception a cependant été observée pour un réplicon obtenu à partir d’une séquence d’un virus isolé d’un patient atteint d’une hépatite fulminante (Kato et al., 2003). Cette souche de génotype 2a, appelée JFH1, a été à la base de la production du système de culture cellulaire pour le HCV (HCVcc) (Lindenbach et al., 2005 ; Wakita et al., 2005 ; Zhong et al., 2005). Ainsi il a été possible pour la première fois de produire du virus infectieux en culture cellulaire après transfection avec de l’ARN génomique du HCV produit *in vitro* à partir d’un ADNc complet du virus sur la base de la séquence complète du virus JFH1 (figure 20) (Wakita et al., 2005 ; Zhong et al., 2005)

ou en utilisant un génome chimérique entre une souche de même génotype (J6) et le virus JFH1 (Lindenbach et al., 2005). Le caractère infectieux de ces virus produits *in vitro* a ensuite été confirmé *in vivo* dans des modèles chimpanzés et de souris chimériques humaines (Bukh et al., 2006 ; Kato et al., 2008 ; Lindenbach et al., 2006).

Dans les études d'entrée et de réplication virale, le système HCVcc a permis de confirmer les résultats obtenus avec les HCVpp ou le système de réplicon. Par exemple, le rôle dans l'entrée virale des facteurs cellulaires tels que CD81, SR-B1, CLDN1 et OCLN a été confirmé dans le modèle HCVcc (Evans et al., 2007 ; Grove et al., 2007 ; Lindenbach et al., 2005 ; Ploss et al., 2009). De plus, l'étape de l'entrée dépendante du pH déjà décrit dans le HCVpp ainsi que l'endocytose médiée par la clathrine, ont été confirmées en utilisant le système du HCVcc (Blanchard et al., 2006 ; Codran et al., 2006). En ce qui concerne la réplication de l'ARN viral, l'implication des lipides cellulaires dans la réplication du HCV, observée avec le système réplicon, a été confirmée avec le système HCVcc (Huang et al., 2007 ; Kapadia & Chisari, 2005 ; Ye et al., 2003).

Une étape majeure a donc été franchie en 2005 avec le développement d'un véritable système de culture cellulaire, en utilisant la souche JFH1 et les cellules d'hépatome Huh-7, permettant ainsi de réaliser des études virologiques sur le HCV. Une des limitations de ce système HCVcc tel qu'initialement développé était qu'il était basé sur une seule souche virale et qu'il utilisait un seul type de lignée cellulaire. Pour étudier les fonctions d'entrée et d'assemblage d'autres génotypes viraux, des virus recombinants entre les séquences des protéines de structure de ces génotypes et la réplicase du JFH1 ont été développés (Gottwein et al., 2007, 2009, 2011 ; Scheel et al., 2008). De plus, des efforts ont été réalisés pour améliorer l'infectiosité en culture cellulaire permettant ainsi d'obtenir des titres viraux plus élevés pour les études du cycle infectieux du HCV ainsi que pour générer des candidats vaccin contre le HCV (Mathiesen et al., 2015). Ces virus recombinants ont permis la caractérisation de nouvelles molécules antivirales et la caractérisation d'anticorps monoclonaux neutralisants (Giang et al., 2012 ; Gottwein et al., 2011, 2013 ; Keck et al., 2013)

En 2012, le système HCVcc a pu être étendu à d'autres souches de HCV. En effet, une étude a montré que des substitutions, dans la protéine NS3-hélicase (F1464), dans NS4A (A1672S) et dans NS5B (D2979G) (Li et al., 2012a), permettent le développement de systèmes de cultures cellulaires robustes pour les génotypes 1a, 2a et 2b du HCV, conduisant ainsi au développement de systèmes efficaces pour d'autres génotypes et sous-types du HCV (Li et al., 2012b ; Ramirez et al., 2014). Récemment, un système de culture efficace pour le génotype 3a a ainsi été mis au point (Ramirez et al., 2016).

Une limitation de ces systèmes de culture est leur dépendance à une seule lignée cellulaire d'hépatome, connue pour avoir de nombreuses anomalies génétiques par rapport aux hépatocytes. Des modèles cellulaires plus proches des hépatocytes ont été développés en se basant notamment sur des cellules souches pluripotentes (Helle et al., 2013 ; Roelandt et al., 2012 ; Yoshida et al., 2011).

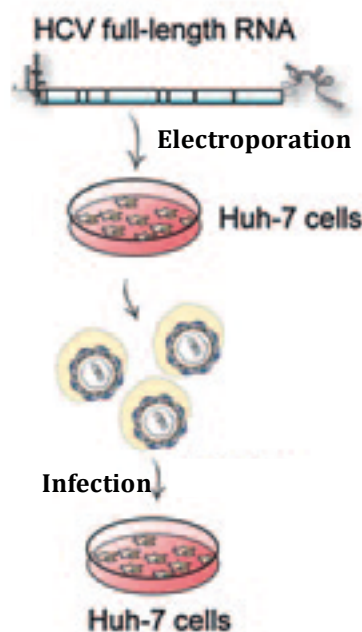


Figure 20. Principe de génération du système de culture HCVcc. Le génome de la souche JFH1 ou d'autres souches du HCV sont transcrits *in vitro*. L'ARN obtenu est transfecté dans des cellules Huh-7, ce qui aboutit à la traduction et la réplication du génome dans ces cellules et à la sécrétion des particules virales infectieuses. Ces particules sont ensuite utilisées pour infecter des cellules natives permettant ainsi de compléter le cycle viral du HCV (Adapté à partir de Steinmann & Pietschmann, 2013).

III.1.d. les hépatocytes primaires humains

Dans les études d'interaction hôte-pathogène *in vitro*, il est important de pouvoir valider les observations initiales en utilisant des systèmes de culture primaire qui représentent le modèle le plus proche du contexte hépatique même s'il est encore loin de représenter les conditions d'organisation tissulaire telles qu'observées dans le foie. Les premières tentatives de production virale en hépatocytes primaires se sont révélées lourdes et peu efficaces (Fournier et al., 1998). Des progrès ont cependant été accomplis notamment en utilisant du virus très infectieux produit *in vitro* et en limitant la réponse immunitaire innée (Helle et al., 2010,

2013 ; Podevin et al., 2010). Ce système rencontre cependant plusieurs limitations. En effet, les hépatocytes présentent une grande variabilité d'un individu à l'autre et l'accès aux hépatocytes reste limité. Ce dernier critère devient cependant moins important car plusieurs sociétés commercialisent maintenant des hépatocytes primaires humains.

III.2. Modèles animaux

III.2.a. Chimpanzés

La recherche sur les virus des hépatites est étroitement liée à l'utilisation du modèle chimpanzé. En effet, ces virus se multiplient difficilement en culture cellulaire et ils présentent pour la plupart une spécificité d'espèce. Les chimpanzés ont donc été beaucoup utilisés pour identifier et caractériser ces virus dont fait partie le HCV (Feinstone et al., 1981). De plus, ce modèle animal s'avère très utile pour déterminer les interactions virus-hôte, en particulier, la réponse immunitaire cellulaire, et pour tester des candidats vaccin contre le HCV (Choo et al., 1994 ; Folgori et al., 2006). Le modèle chimpanzé a également été essentiel pour la validation des premiers clones infectieux. La reconstitution du génome complet du HCV a permis de construire un clone infectieux à partir d'une séquence consensus d'un virus de sous-type 1a (souche H77). L'ARN génomique a pu être validé *in vivo* par injection intra-hépatique du génome viral chez le chimpanzé (Kolykhalov et al., 1997 ; Yanagi et al., 1997). Ces travaux ont permis pour la première fois de valider la fonctionnalité d'une séquence génomique virale produite *in vitro* (figure 21). En outre, ces études ont prouvé que le HCV provoque une maladie hépatique, puisque les chimpanzés transfectés avec l'ARN génomique du HCV ont développé une hépatite aiguë. Ces clones infectieux du HCV ont permis pour la première fois des études de génétique inverse chez le chimpanzé afin de déterminer l'importance de composants génétiques, comme la région 3'UTR, le polypeptide p7 et les enzymes virales clés, dans l'infectiosité du virus (Kolykhalov et al., 2000 ; Sakai et al., 2003 ; Yanagi et al., 1999). De plus, le modèle chimpanzé s'est également montré utile pour valider des approches vaccinales contre le HCV (Dahari et al., 2010).

Il est à noter que les chimpanzés infectés par le HCV présentent une évolution de l'infection similaire à celle observée chez l'homme. Cependant, entre les chimpanzés et les humains des différences subtiles existent. En effet, l'infection est majoritairement chronique chez l'homme alors qu'elle évolue beaucoup moins fréquemment vers la chronicité chez le chimpanzé. De

plus, ces animaux ne développent ni fibrose, ni cirrhose et un seul CHC a été observé. L'absence d'efficacité du traitement par les IFN chez les chimpanzés mise en évidence par un niveau stable de charge virale malgré l'administration d'IFN est une autre différence importante entre les humains et les chimpanzés.

Par ailleurs, en raison des contraintes éthiques qui évoluent ainsi que les coûts élevés et les difficultés d'entretien associées aux études chez les chimpanzés, d'autres animaux ont été testés pour leur capacité à soutenir l'infection par le HCV.

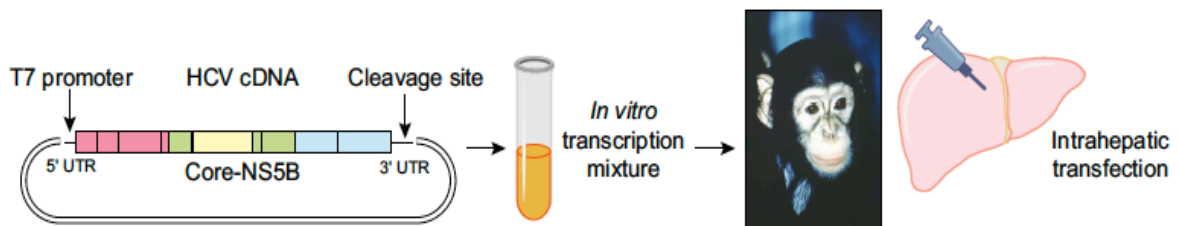


Figure 21. Production des clones d'ADNc du HCV infectieux. Le génome (ADNc) du HCV est inséré dans une construction permettant la transcription *in vitro* de l'ARN. Cet ARN est ensuite transfecté dans les hépatocytes des chimpanzés en raison de l'absence des systèmes de culture cellulaire (Adapté à partir de Bukh, et al., 2016).

III.2.b. Les toupayes

Tupaia belangeri est un petit mammifère originaire d'Asie du Sud-Est qui ressemble à l'écureuil. Il a été montré que les toupayes sont sensibles à une variété de virus humains comprenant le virus de l'herpès simplex, le rotavirus et le HBV. En 1998, une étude a montré que les toupayes pouvaient être infectés par le HCV mais cette infection était transitoire et n'aboutissait pas à une infection durable après inoculation avec du sérum provenant des patients infectés (Xie et al., 1998). En 2002, une deuxième étude a montré que les toupayes infectés par le HCV, provenant des patients infectés par le virus, présentaient une répllication efficace du virus dans les hépatocytes de ces animaux (Zhao et al., 2002). Une étude plus récente en 2010, a montré qu'après inoculation avec du sérum des patients infectés ou avec des particules virales du HCVcc, les animaux présentaient une faible inflammation et une virémie pendant la phase aiguë de l'infection suivie plus tard par le développement d'une stéatose hépatique et des nodules cirrhotiques contrairement à ce qui a été observé avec les chimpanzés. De plus, l'injection de sérum de toupayes infectés à des individus sains a donné lieu à une infection aiguë, montrant ainsi une répllication efficace et une transmission

potentielle du HCV entre ces animaux (Amako et al., 2010). De plus, il a été montré que l'étape d'entrée du HCV dans les hépatocytes de toupayes est en accord avec les connaissances actuelles sur l'importance des récepteurs d'entrée identifiés chez l'homme (Tong et al., 2011).

Donc, le toupaye constitue un modèle potentiellement intéressant pour étudier les étapes d'entrée et de réplication du HCV. Cependant, un inconvénient de ce modèle est que contrairement à ce qui a été observé chez l'homme, ces animaux présentent une virémie faible et transitoire (Amako et al., 2010 ; Xu et al., 2007).

III.2.c. Les rongeurs

Le modèle de choix en recherche biomédicale est la souris. Malheureusement, cet animal n'est pas sensible à l'infection par le HCV. Des recherches ont donc été développées afin de comprendre pourquoi les hépatocytes murines sont naturellement résistants à l'entrée du HCV et ne permettent qu'un faible taux de réplication chez ces animaux. En fin du compte, le fait de surmonter cette résistance pourrait fournir un modèle murin intéressant pour la réplication du HCV ainsi que le développement des stratégies immunitaires potentielles pour bloquer l'entrée et la réplication du HCV chez l'homme.

III.2.a.i. Les souris génétiquement humanisées avec les récepteurs d'entrée

L'hypothèse de départ pour expliquer l'absence d'infection de la souris par le HCV était que ce virus ne reconnaît pas un ou plusieurs co-récepteurs. Ceci est basé sur l'observation initiale indiquant que la glycoprotéine E2 ne reconnaît pas la forme murine de CD81 (Pileri et al., 1998). Plus tard, il a également été montré que l'OCLN murine n'est pas fonctionnelle pour l'entrée du HCV (Ploss et al., 2009). Pour tenter de lever le blocage d'entrée, une approche intéressante a consisté à exprimer de façon transitoire les facteurs d'entrée humains CD81, CLDN1, OCLN et SR-B1, chez les souris à l'aide d'adénovirus recombinants (figure 22). Cette approche a permis pour la première fois d'induire l'entrée du HCVcc dans les hépatocytes de souris et a permis l'évaluation de candidats du vaccin et d'inhibiteurs d'entrée (Colpitts et al., 2013 ; Dorner et al., 2011 ; Giang et al., 2012). Par la suite des souris transgéniques exprimant ces quatre facteurs d'entrée humaines (4hEF), et déficientes pour plusieurs voies de signalisation immunitaire innée, n'ont pas seulement permis l'entrée de HCVcc mais également un faible taux de réplication (Dorner et al., 2013). En utilisant une

approche transgénique similaire du CD81/OCLN, il a été montré que des isolats de HCV, autre que le HCVcc, pouvaient infecter et se répliquer chez des souris qui ont un système immunitaire inné intact, bien qu'avec un très faible niveau de virémie (Chen et al., 2014). Les différences entre les souris ICR utilisées dans cette dernière étude et les souris C57BL/6 utilisées dans le modèle 4hEF suggèrent que des différences génétiques entre ces souris pourraient être importantes pour la réplication de plusieurs isolats de HCV. L'ApoE, connue pour améliorer la production de HCV dans les cellules hépatiques murines (Long et al., 2011), était davantage exprimée et le miR-122 (Jopling et al., 2005) était également beaucoup plus actif, lors de l'infection par le HCV, dans les souris ICR (exprimant CD81/OCLDN) que dans les souris C57BL/6 (Chen et al., 2014). Ces facteurs hépatiques sont cruciaux pour la réplication et l'assemblage du HCV expliquant ainsi la persistance des infections par le HCV chez les souris transgéniques.

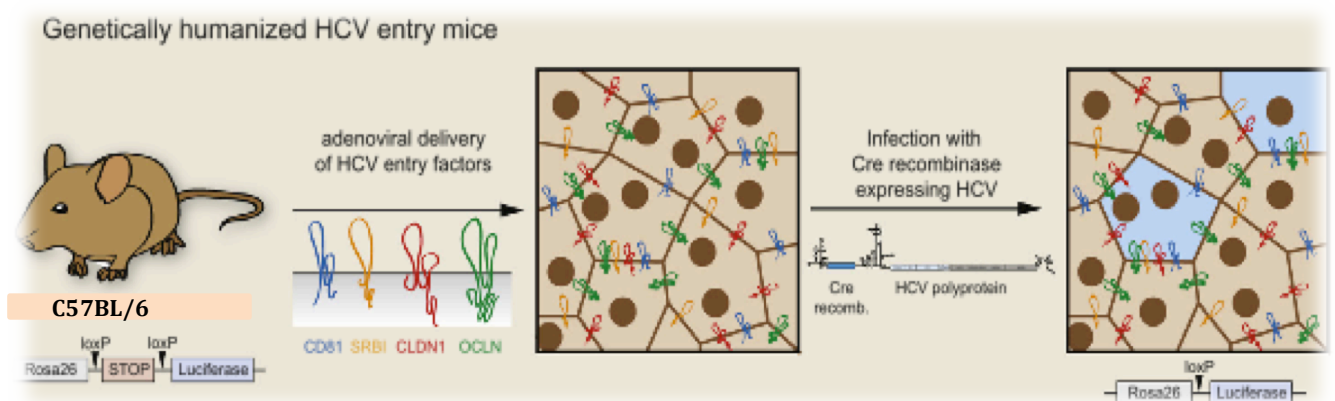


Figure 22. Principe de génération de souris humanisées pour les récepteurs du HCV. Des souris C57BL/6 sont rendues sensibles à l'entrée du HCV par une expression transitoire des facteurs d'entrée humains (CD81, CLDN1, OCLN et SR-B1) avec un adénovirus. Le gène de la luciférase est utilisé afin de mettre en évidence la réplication du HCV (Adapté à partir de Catanese & Dorner, 2015).

III.2.a.ii. Les souris chimériques xénotransplantées

L'établissement des souris dont le foie est xéno greffé avec des hépatocytes humains a été une révolution très importante pour l'étude du HCV. Dans ce modèle murin, le foie de souris immunodéficientes chimériques est reconstitué par injection d'hépatocytes primaires humains dans des souris ayant une déficience immunitaire génétique ainsi que des lésions hépatiques constitutives ou inductibles (Bissig et al., 2007 ; Mercer et al., 2001 ; Meuleman et al., 2005) (Figure 23). L'immunodéficience est nécessaire pour éviter le rejet des greffes xénogéniques.

Les hépatocytes ont une capacité de régénération remarquable qui, après migration et incorporation dans le foie, permettent de repeupler largement et parfois presque complètement le parenchyme hépatique (Fausto et al., 2006 ; Sandgren et al., 1991). Essentiellement deux types de souris ont été utilisés pour la production de souris chimères humanisées: le modèle uPA-SCID et le modèle FRG (Vercauteren et al., 2014). La susceptibilité à l'infection par le HCV a également été montrée dans d'autres modèles immuno-déficients comme les MUP-uPA (Tesfaye et al., 2013) et les souris TK-NOG (Kosaka et al., 2013). Bien que des différences subtiles existent entre ces divers modèles, ces derniers sont très similaires, permettant ainsi une infection robuste et reproductible des isolats naturels du virus et du HCV produit en culture cellulaire (Bukh et al., 2010 ; Lindenbach et al., 2006). Ces souris humanisées ont été très utiles pour l'étude des aspects fondamentaux du cycle viral (Doerrbecker et al., 2013 ; Kaul et al., 2007 ; Pietschmann et al., 2009 ; Vassilaki et al., 2008), l'évaluation d'anticorps neutralisants (De Jong et al., 2014 ; Law et al., 2008 ; Meuleman et al., 2011) et de nouvelles thérapies antivirales (Bissig et al., 2010 ; Meuleman et al., 2011 ; Ohara et al., 2011).

Puisque les hépatocytes humains primaires qui résident dans le foie de souris humanisées conservent un grand nombre de leurs fonctions, ces souris chimériques ont également été employées pour étudier *in vivo* d'autres microorganismes hépatotropes tels que le HBV (Meuleman et al., 2006), le HDV (Giersch et al., 2014) et Plasmodium falciparum, l'agent causal du paludisme (Sacci et al., 2006).

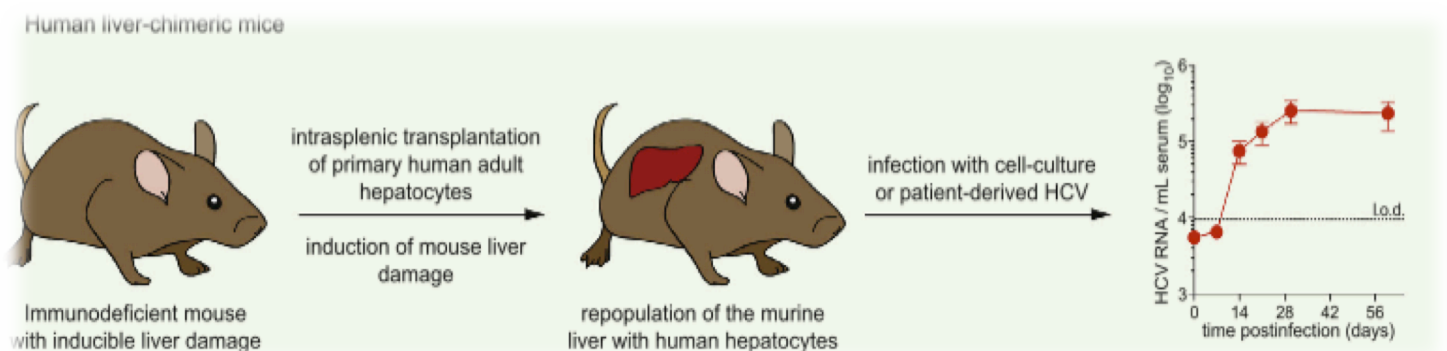


Figure 23. Principe de génération des souris chimériques xénotransplantées. Ce modèle utilise des souris immunodéficientes afin d'éviter tout rejet des hépatocytes humains. Ces cellules ont la capacité de proliférer et de repeupler les lésions hépatiques chez ces souris avec un taux qui peut atteindre 90%, ce qui rend ces souris permissives à l'infection par le HCV. La quantification de l'ARN viral, dans le sérum des souris, montre une réplication virale efficace dans les hépatocytes humains au niveau du foie des souris (Adapté à partir de Catanese & Dorner, 2015).

III.2.a.iii. Les souris xénotransplantées immunocompétentes

Afin d'éviter le rejet des hépatocytes humains greffés, les modèles de souris chimériques nécessitent une déficience du système immunitaire. Cependant, les études d'immunopathogénèse du HCV, de la réponse immunitaire primaire (humaine) et d'efficacité des vaccins chez les souris nécessiteraient à la fois une xéno greffe de cellules hépatiques et un système immunitaire humain fonctionnel du même donneur chez la même souris receveuse. Ceci a été récemment accompli en combinant des hépatocytes humains adultes et des cellules souches hématopoïétiques humaines CD34 + (HSC) de différents sujets donneurs (Gutti et al., 2014 ; Wilson et al., 2014) (figure 24). En plus de ce système allogénique, un modèle de souris syngénique a été généré par injection intrahépatique des hépatoblastes humains (cellules progénitrices d'hépatocytes) et de HSC CD34+ à partir d'un même fœtus (Washburn et al., 2011) (figure 24). D'une manière très intéressante ces modèles développent une fibrose hépatique ainsi qu'une réponse immunitaire cellulaire humaine anti-HCV. Cependant, le nombre assez faible des hépatocytes humains dans le foie de ces souris pourrait entraver les études d'infection par le HCV.

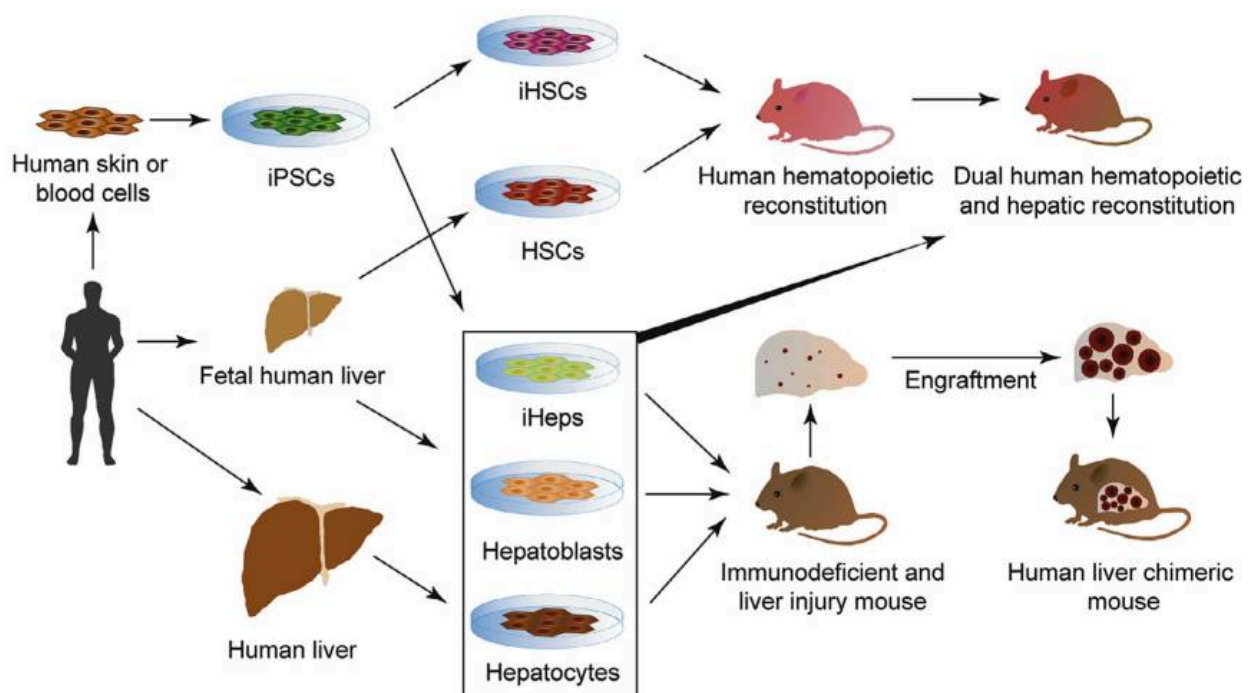


Figure 24. Principe de génération des souris xénotransplantées immunocompétentes. Les différents processus utilisés pour générer à la fois des souris xéno greffées et immunocompétentes sont montrés (Adapté à partir de von Schawen & Ploss, 2014).

IV. le cycle viral du HCV

IV.1. l'entrée virale

IV.1.a. Les facteurs d'attachement

IV.1.a.i. Les Lectines : DC-SIGN et L-SIGN

Les lectines DC-SIGN (pour dendritic cell-specific ICAM-grabbing non-integrin) et L-SIGN (pour Liver-specific ICAM-grabbing non-integrin) sont des protéines transmembranaires de type II qui interagissent avec des glycanes de type oligomannosidique dans un processus dépendant du calcium. Il a été montré que la glycoprotéine E2 interagit avec ces lectines et cela a été confirmé avec le modèle HCVpp ainsi qu'avec des particules isolées de sérums de patients (Gardner et al., 2003 ; Pöhlmann et al., 2003). Les récepteurs DC-SIGN sont exprimés au niveau des cellules de Kuppfer, des lymphocytes et des cellules dendritiques, alors que les L-SIGN sont présentes au niveau des cellules endothéliales sinusoidales du foie. Le rôle précis de ces lectines dans le cycle infectieux du HCV n'est pas très clair car elles ne sont pas exprimées sur les hépatocytes. Elles pourraient cependant jouer un rôle indirect en facilitant le transport au site d'infection pour les DC-SIGN ou en translocant le virus à travers l'endothélium hépatique pour les L-SIGN (Cormier et al., 2004a ; Gardner et al., 2003 ; Lozach et al., 2004).

IV.1.a.ii. Les Glycosaminglycanes (GAGs)

De façon générale, les GAGs sont des facteurs d'attachement de faible affinité pour les virus y compris pour le HCV. Cette interaction initiale avec la surface cellulaire facilite la liaison ultérieure du virus aux récepteurs spécifiques (Barth et al., 2003 ; Germi et al., 2002). Il existe plusieurs types de GAGs hautement sulfatés. Cependant des interactions n'ont été observées qu'entre le HCV et les héparanes sulfates (HS) (Barth et al., 2006 ; Cribier et al., 1998 ; Germi et al., 2002; Thomssen et al., 1992). L'implication de ces facteurs dans l'attachement du HCV a été confirmée par traitement des cellules cibles du HCV à l'héparinase, résultant en une inhibition de l'attachement du virus à la surface cellulaire (Barth et al., 2006 ; Basu et al., 2007 ; Koutsoudakis et al., 2006 ; Morikawa et al., 2007). Bien qu'il ait été proposé initialement une interaction directe entre les glycoprotéines du HCV et les GAGs, des résultats plus récents montrent que la particule virale interagit avec ces molécules par

l'intermédiaire de l'ApoE, une apolipoprotéine associée au virion HCV (Jiang et al., 2012 ; Xu et al., 2015).

IV.1.a.iii. Les récepteurs aux LDL (LDLr)

La particule virale du HCV a la particularité d'être associée à des lipoprotéines de type LDL ou VLDL et, de ce fait, il a été suggéré que le LDLr pourrait être un facteur d'attachement pour le HCV (Agnello et al., 1999 ; Monazahian et al., 1999 ; Wünschmann et al., 2000). Les VLDL sont des lipoprotéines contenant deux apolipoprotéines principales: l'apolipoprotéine B (ApoB, en une seule copie par particule) et ApoE (en plusieurs copies par particule). L'assemblage du HCV est étroitement lié à la biogenèse des VLDL au sein des hépatocytes (Huang et al., 2007). Après leur sécrétion dans la circulation sanguine, les VLDL subissent des transformations. Après l'hydrolyse des triglycérides par la lipoprotéine lipase hépatique (LPL), une fraction subit directement une internalisation, médiée par l'ApoE, au niveau des hépatocytes tandis qu'une autre fraction se débarrasse de l'ApoE et est par la suite transformée en lipoprotéines de faible densité (LDL). L'ApoB est la seule apolipoprotéine des LDL qui permet l'internalisation des LDL par les LDLr (Brown & Goldstein, 1986). Il est intéressant de noter que la partie lipoprotéique associée au HCV subit de la même manière des modifications dans la circulation sanguine (Felmlee et al., 2010). Il a été montré que des particules isolées des patients infectés par le HCV interagissent avec le récepteur aux LDL par l'intermédiaire des lipoprotéines associées aux virions (Agnello et al., 1999). Cependant, les études sur le rôle du LDLr dans l'entrée du HCV ont été limitées par l'absence d'un système infectieux pertinent. En effet, le système HCVpp est produit dans des lignées cellulaires non hépatiques qui ne synthétisent pas des lipoprotéines. C'est donc grâce au système HCVcc que le rôle du récepteur LDLr a été déterminé. L'inhibition de l'expression du LDLr par des siRNA a montré une inhibition de l'infection du HCVcc (Owen et al., 2009). De plus, les anticorps anti-VLDL et anti-ApoE inhibent l'infection du HCVcc, alors que les anticorps anti-LDL (anti-ApoB) ne semblent avoir aucun effet (Chang et al., 2007 ; Owen et al., 2009). Ces études suggèrent que le LDLr pourrait capturer le HCV à la surface des cellules hépatocytaires par interaction avec l'ApoE et conduire à une infection productive médiée par les autres facteurs d'entrée actifs. Une autre étude a cependant montré que le prétraitement du virion avec la lipoprotéine lipase (LPL) réduit l'infectiosité du HCV tout en augmentant son internalisation, ce qui suggère que l'internalisation du HCV médiée par le LDLr conduirait à une voie non productive d'entrée virale (Albecka et al., 2012 ; Andreo et al., 2007). Il est à

noter que l'ApoE peut se lier à d'autres récepteurs sur la surface cellulaire, y compris le récepteur SR-BI (Andreo et al., 2007). Plus récemment, il a été montré que les récepteurs aux lipoprotéines LDLr et SR-BI ainsi que le VLDLr participent de façon redondante à l'entrée cellulaire du HCV (Yamamoto et al., 2016).

IV.1.b. Les récepteurs

IV.1.b.i. La tétraspanine CD81

Le récepteur CD81 est une protéine membranaire non glycosylée de la famille des tétraspanines. CD81 est exprimée de façon ubiquitaire et, comme les autres membres de cette famille, elle possède quatre passages transmembranaires ainsi qu'une petite et une grande boucle extracellulaire (SEL et LEL, respectivement). Les régions N- et C-terminales de CD81 se trouvent à l'intérieur de la cellule (figure 25). La molécule CD81 est impliquée dans différents processus cellulaires tels que l'adhésion, la morphologie, l'activation, la prolifération et la différenciation cellulaire (Hemler, 2003 ; Levy & Shoham, 2005).

En l'absence de système de culture cellulaire, les premières approches pour identifier un récepteur potentiel pour le HCV ont été d'utiliser une forme soluble de la glycoprotéine E2 (sE2). Il a ainsi été proposé que la molécule CD81 serait un co-récepteur du HCV (Pileri et al., 1998). Cette interaction semble être spécifique d'espèce, car la sE2 ne reconnaît la protéine CD81 de souris ou de rat (Flint et al., 2006). Les deux ponts disulfures, qui stabilisent la boucle LEL ont été montrés comme essentiels pour l'interaction de CD81 avec sE2 (Pileri et al., 1998 ; Drummer et al., 2005). Le rôle du CD81 dans l'infection par le HCV a ensuite été confirmé par d'autres approches expérimentales. En effet, les lignées cellulaires d'hépatome humaine non permissives telles que HH29 et HepG2, qui n'expriment pas le CD81, deviennent sensibles à l'infection par HCVcc et HCVpp lorsqu'elles sont complétées par ce récepteur (Bartosch et al., 2003b, Cormier et al., 2004b; Lavillette et al., 2005). L'infection de cellules Huh-7 par des HCVcc ou HCVpp est inhibée en présence d'anticorps anti-CD81 *in vitro* et *in vivo* (Bartosch et al., 2003a; Cormier et al., 2004b; Hsu et al., 2003; Meuleman et al., 2008 ; Molina et al., 2008 ; Wakita et al., 2005). Une fois stimulé, le récepteur CD81 est responsable de l'activation de plusieurs voies de signalisation cellulaires (*cf partie IV. Le cycle viral du HCV*). D'autre part, le CD81 possède un rôle dans la régulation de la réponse immunitaire adaptative. De ce fait, il a été suggéré que l'interaction du HCV avec des cellules B ou T par l'intermédiaire de CD81 pourrait conduire à des

manifestations extra-hépatiques telles qu'observées chez les patients infectés chroniques (Crotta et al., 2002; Wack et al., 2001).

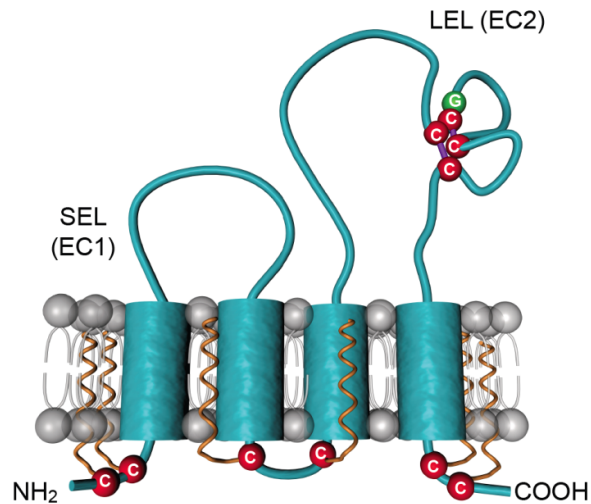


Figure 25. Représentation schématique du récepteur CD81. CD81 comporte quatre segments transmembranaires et deux boucles extracellulaires (SEL et LEL). Les ponts disulfures sont désignés par le motif CCG au niveau de la LEL. La boucle LEL est responsable de l'interaction avec le HCV (Adapté à partir de Fénéant et al., 2014).

IV.1.b.ii. SR-BI

Le récepteur scavenger BI (SR-BI) est une glycoprotéine de 509 a.a. présentant deux passages transmembranaires, deux domaines cytoplasmiques et une grande boucle extracellulaire avec 9 sites de N-glycosylation (Acton et al., 1994 ; Calvo & Vega, 1993 ; Rhains & Brissette, 2004) (figure 26). Le récepteur SR-BI possède plusieurs ligands tels que les VLDL, LDL et HDL. Comme pour CD81, SR-BI a été identifié comme co-récepteur du HCV sur base de son interaction avec la glycoprotéine sE2 (Scarselli et al., 2002). De plus, il a été montré que c'est la région HVR1 de E2 qui interagit avec SR-BI (Bartosch et al., 2003c ; Scarselli et al., 2002). Le rôle de SR-BI dans l'entrée cellulaire du HCV a ensuite été confirmé dans le modèle HCVpp (Bartosch et al., 2003b). Il est à noter que la fonction de transfert lipidique de SR-BI facilite l'entrée du HCV. En effet, les HDL facilitent l'entrée virale en interagissant avec SR-BI (Bartosch et al., 2005; Dreux et al., 2006 ; Voisset et al., 2005). De plus, ces lipoprotéines affectent l'activité des anticorps neutralisants en activant l'entrée virale par interaction avec SR-BI (Dreux et al., 2006 ; Voisset et al., 2006). Le rôle de SR-BI dans l'entrée virale semble cependant plus complexe qu'une simple interaction entre la glycoprotéine E2 et ce co-récepteur. Il a en effet été proposé que la partie lipoprotéique de la particule virale jouerait un

rôle dans l'interaction avec SR-BI et que ce récepteur jouerait son rôle essentiellement par l'intermédiaire de sa fonction de transfert lipidique, alors que l'interaction avec E2 jouerait uniquement un rôle facilitateur (Dao Thi et al., 2012). Il est à noter que le niveau d'expression de SR-BI peut moduler l'entrée cellulaire du HCV (Grove et al., 2007). Comme discuté plus haut, il a également été montré que les récepteurs aux lipoprotéines LDLr et SR-BI ainsi que le VLDLr participent de façon redondante à l'entrée cellulaire du HCV (Yamamoto et al., 2016). Cependant, il est à noter que le récepteur VLDLr n'est pas exprimé dans les cellules hépatiques en conditions normoxiques et même s'il peut faciliter l'entrée du HCV (Ujino et al., 2016), ce n'est donc pas un récepteur pour ce virus dans les conditions physiologiques.

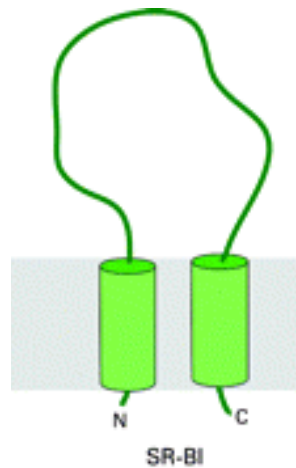


Figure 26. Représentation schématique du récepteur SR-BI. La structure montre deux passages transmembranaires avec une boucle extracellulaire, cette dernière est impliquée dans l'interaction avec les lipoprotéines ainsi qu'avec le HCV (Adapté de Timpe & McKeating, 2008).

IV.1.b.iii CLDN1.

La molécule claudine-1 (CLDN1) est une protéine de jonctions serrées (Greber & Gastaldelli, 2007) (figure 27). Elle comprend 211 a.a. et, comme les autres membres de la famille des claudines, elle contient quatre passages transmembranaires, deux boucles extracellulaires et trois domaines intracellulaires (Van Itallie & Anderson, 2006). La CLDN1 a été identifiée comme co-récepteur du HCV suite au criblage d'une banque de cADN hépatique dans des cellules HEK293 et infectées par des HCVpp (Evans et al., 2007). Cette lignée naturellement non permissive pour l'entrée du HCV ne s'est révélée infectable par des HCVpp qu'après la

complémentation pour la CLDN1. Il est à noter que cette protéine est exprimé dans un bon nombre de tissus différents (Furuse et al., 1998). Des analyses supplémentaires ont montré que la première boucle extracellulaire (EL1) joue un rôle actif dans l'entrée virale (Evans et al., 2007) (figure 27). Il n'a pas été montré d'interaction directe entre CLDN1 et le HCV, l'attachement du HCV sur CD81 entraîne le recrutement de CLDN1 qui forme un complexe CD81-CLDN1 impliqué dans l'internalisation virale (Farquhar et al., 2012). Il est à noter que la famille des claudines comprend 24 membres et parmi ceux-ci, CLDN6 et CLDN9, peuvent remplacer CLDN1 dans l'entrée cellulaire du HCV (Meertens et al., 2008 ; Zheng et al., 2007). Cependant, CLDN6 et CLDN9 sont peu exprimées au niveau du foie (Fofana et al., 2013) et leur implication réelle dans l'entrée du HCV n'est pas entièrement élucidée.

IV.1.b.iv. OCLN

La protéine de jonction serrée occludine (OCLN) est une protéine de 60 kDa présentant deux boucles extra-cellulaires, quatre passages transmembranaires et des régions N- et C-terminales intracellulaires (Furuse et al., 1993) (figure 27). L'OCLN a été identifiée comme co-récepteur du HCV suite au criblage d'une banque d'ADNc hépatique dans des cellules NIH3T3 et infectées par des HCVpp (Ploss et al., 2009). L'inhibition de l'expression de l'OCLN avec des siRNA a permis de confirmer son rôle dans l'entrée virale (Liu et al., 2009). Il est à noter que seule l'OCLN humaine permet de restaurer l'entrée virale (Ploss et al., 2009).

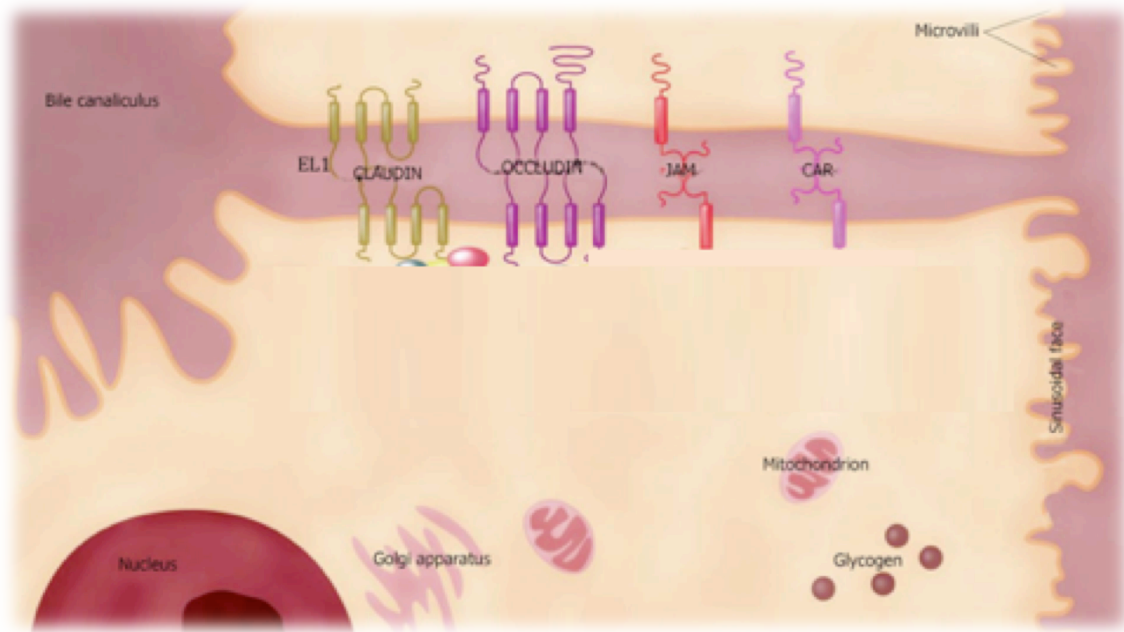


Figure 27. Structure des jonctions serrées au niveau du foie des mammifères. La CLDN-1 et l'OCLN sont impliquées dans l'entrée du HCV. CLDN-1 est composé de quatre passages transmembranaires avec 3 domaines intracellulaires et deux boucles extracellulaires. La boucle EL1 est essentielle pour l'entrée du HCV. L'OCLN présente deux boucles extracellulaires, 3 domaines intracellulaires et quatre passages transmembranaires (Adapté à partir de Lee & Luk, 2010).

IV.1.b.v. Autres facteurs d'entrée : NPC1L1, EGFR, Tfr1

1. L'EGFR et l'EphA2

Plusieurs autres facteurs d'entrée cellulaire du HCV ont également été identifiés. Il s'agit notamment du récepteur à l'EGF (EGFR) et du récepteur de l'éphrine A2 (EphA2). L'EGFR et l'EphA2 sont des récepteurs à activité tyrosine kinases (RTK), possédant d'importantes fonctions cellulaires (Schneider & Wolf, 2009). Il a été montré que l'entrée ainsi que l'infection du HCV sont complètement inhibées par des inhibiteurs d'EGFR et d'EphA2 (erlotinib et dasatinib) et cela a été observé pour tous les génotypes du HCV (Lupberger et al., 2011). L'EGFR ne semble pas interagir avec le virus mais sa stimulation par l'EGF conduit à l'interaction entre CD81 et CLDN1, par le biais d'une stimulation par le facteur HRas (Lupberger et al., 2011 ; Zona et al., 2013). De plus, le rôle de l'EGFR a été confirmé dans le modèle de souris uPA-SCID, confirmant ainsi son implication en tant que facteur d'entrée du HCV (Lupberger et al., 2011). Enfin, il est à noter que le récepteur EGFR représente une nouvelle cible pour les traitements antiviraux contre le HCV.

2. NPC1L1

Le récepteur NPC1L1 (pour Niemann-Pick C1-like1 cholesterol absorption receptor) est une protéine transmembranaire possédant 13 passages transmembranaires (figure 28). Cette protéine est exprimée à la surface des hépatocytes au niveau du pôle apicale. Elle a été identifiée comme un autre facteur d'entrée du HCV (Sainz et al., 2012) à partir des observations suivantes: (a) sa déplétion par des siRNA ou son blocage par des anticorps spécifiques (anti-LEL1) entraîne une réduction drastique de l'infection par le HCV; (b) l'ezetimibe, un antagoniste du NPC1L1 (inhibiteur de son internalisation), utilisé pour diminuer le taux de cholestérol dans le sang, a montré une inhibition de l'entrée du HCV *in vitro* d'une manière dose-dépendante et un retard dans l'établissement de l'infection par le HCV chez des souris chimères avec un foie humanisé ; (c) enfin, son implication dans l'entrée du HCV a été corrélée à la quantité de cholestérol associé au virion puisque l'entrée du HCV est modulée par l'absorption du cholestérol par les hépatocytes (Bartenschlager et al., 2011 ; Kapadia & Chisari, 2005 ; Ye, 2007).

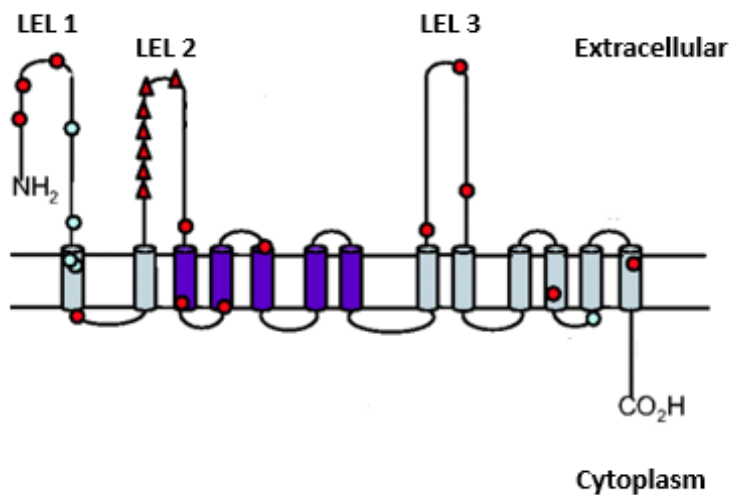


Figure 28. Représentation schématique de la structure du récepteur NPC1L1. Le NPC1L1 est composé de 13 passages transmembranaires avec 3 boucles extracellulaires (LEL1-3), un domaine N-terminal extracellulaire et un domaine C-terminal intracellulaire. (Adapté de Weinglass et al., 2008).

3. TfR1

Le récepteur de la transferrine 1 (TfR1) a également été identifié comme un facteur d'entrée du HCV (Martin & Uprichard, 2013). Une étude cinétique a montré que le TfR1 fonctionne à une étape tardive de l'entrée du HCV, après le CD81. En outre, son rôle dans la transmission cellule-cellule du HCV a été étudié et les données ont montré que le TfR1 peut améliorer la transmission cellule-cellule du HCV, mais il n'est pas crucial pour ce processus (Martin & Uprichard, 2013).

La découverte du TfR1 comme facteur d'entrée du HCV a conduit à des études plus approfondies sur le lien entre l'homéostasie du fer et l'infection par le HCV. Les études précoces ont révélé que les patients atteints d'une infection chronique par le HCV se trouvent généralement avec un taux sérique élevé du fer (y compris la ferritine et la saturation en transferrine) et avec une accumulation du fer dans le foie, ce qui pourrait aggraver les symptômes hépatiques (Bonkovsky et al., 2002 ; Fabris et al., 2001 ; Metwally et al., 2004 ; Weiss et al., 1994).

IV.1.c. Mécanisme d'entrée et d'internalisation du HCV

Au cours d'une infection primaire, les particules du HCV sont transportées par le flux sanguin et entrent en contact avec les hépatocytes après avoir traversé l'endothélium des sinusoides hépatiques. Les virions entrent ensuite en contact direct avec la surface basolatérale des hépatocytes. Cela leur permet d'interagir avec les facteurs d'attachement et les co-récepteurs présents à la surface des cellules cibles. La fixation initiale des particules du HCV sur les hépatocytes est médiée par les GAGs comme les héparanes sulfates (Lefèvre et al., 2014 ; Shi et al., 2013) ou par le SR-BI (Thi et al., 2012), qui dépend de la densité du virion.

Pendant longtemps, Les glycoprotéines du HCV ont été considérées comme responsables de la liaison du virion aux héparanes sulfates (Barth et al., 2003) ou SR-BI (Scarselli et al., 2002). Cependant des études plus récentes indiquent que l'ApoE et non les glycoprotéines virales sont impliquées dans cette interaction initiale (Jiang et al., 2013 ; Thi et al., 2012).

En raison de l'interaction des particules du HCV avec les lipoprotéines, le récepteur aux LDL (LDLr) a également été proposé comme facteur d'attachement dans l'entrée du HCV (Agnello et al., 1999). Le LDLr pourraient être impliqué dans une voie d'entrée non productive qui peut potentiellement conduire à la dégradation des particules virales (Albecka et al., 2012). Cependant, il a été montré que le LDLr peut compenser la fonction du récepteur SR-BI dans

l'entrée du HCV dans le contexte d'une lignée déficiente pour ce dernier (Yamamoto et al., 2016).

Après l'attachement initial à la surface de la cellule, les étapes suivantes d'entrée du HCV ne sont que partiellement comprises et elles impliquent une série de facteurs d'entrée cellulaires spécifiques (figure 29). Il s'avère que l'action coordonnée, d'au moins quatre facteurs cellulaires majeurs, est essentielle pour l'entrée du HCV. Ils comprennent SR-BI (Scarselli et al., 2002), la tétraspanine CD81 (Pileri et al., 1998) et les protéines de jonction serrée CLDN1 (Evans et al., 2007), et OCLN (Ploss et al., 2009). En raison de sa double interaction avec la glycoprotéine E2 du HCV et les lipoprotéines, SR-BI pourrait jouer un rôle précoce dans l'entrée virale, en interagissant avec le virion après l'attachement cellulaire initial.

L'implication de SR-BI dans l'entrée du HCV a d'abord été suggérée par sa capacité à interagir avec la glycoprotéine E2 par l'intermédiaire de sa région hypervariable 1 (HVR1) (Scarselli et al., 2002). Cependant, SR-BI semble également contribuer à l'attachement du virus par l'interaction avec les lipoprotéines associées à la particule virale (Maillard et al., 2006 ; Thi et al., 2012). Les mutants du HCV ayant une délétion de HVR1 ou une mutation qui empêche la liaison de E2 à SR-BI restent dépendants de SR-BI au niveau de l'étape d'entrée dans les cellules (Thi et al., 2012). Il a été proposé que l'activité de transfert lipidique pourrait modifier la composition lipidique de la fraction lipoprotéine du virion, ce qui conduirait à une meilleure exposition du site de liaison à CD81 de la glycoprotéine E2 (Thi et al., 2012 ; Zahid et al., 2013). Quel que soit le phénomène impliqué, le virus semble interagir avec CD81 après la liaison à SR-BI.

La tétraspanine CD81 est un co-récepteurs central dans l'entrée du HCV (Fénéant et al., 2014). Il joue un rôle dans l'entrée cellulaire du HCV en interagissant avec CLDN1 (*cf partie IV.1.b. les récepteurs*). L'interaction CD81-CLDN1 semble être régulée par de multiples voies de signalisation. Cette interaction semble être favorisée par l'EGFR et aussi potentiellement par la protéine kinase A (Farquhar et al., 2008 ; Lupberger et al., 2011). Après stimulation de l'EGFR, la voie Ras/MEK/ERK est activée, ce qui pourrait conduire à l'activation de la sérine/thréonine kinase 1 (MKNK1) qui interagit avec MAPK, une kinase facilitant l'entrée du HCV après l'activation de l'EGFR (Kim et al., 2013). De plus, l'activation de l'EGFR stimule également la protéine HRas, qui à son tour s'associe à CD81, et cette interaction est requise pour la diffusion latérale du CD81, qui permet la formation du complexe CD81-CLDN1 (Zona et al., 2013). D'autre part, l'EGFR facilite la co-internalisation de CD81-CLDN1 avec des particules de HCV. Après interaction avec le complexe CD81-CLDN1, la particule virale active également de manière transitoire la voie PI3K-AKT pour faciliter son entrée (Liu et al.,

2012). Enfin, il a également été montré que la liaison de E2 à CD81 induit la signalisation de Rho GTPases qui contribue à un réarrangement du cytosquelette d'actine et pourrait donc également affecter la mobilité du CD81 sur la membrane cellulaire (Brazzoli et al., 2008). Il a également été proposé que l'interaction du HCV, via la glycoprotéine E2, avec le récepteur CD81 favoriserait la fusion entre les protéines d'enveloppe du HCV et la membrane cellulaire (Sharma et al., 2011).

L'OCLN est également un facteur d'entrée essentiel pour le HCV (Ploss et al., 2009) (*cf partie IV.1.b. les récepteurs*). Cependant, le rôle précis de l'OCLN dans le cycle viral du HCV reste mal compris. Il semble jouer un rôle à une étape tardive de l'entrée (Benedicto et al., 2009 ; Sourisseau et al., 2013). Il est à noter que, avec CD81, OCLN détermine le tropisme du HCV aux cellules humaines (Dorner et al., 2011 ; Ploss et al., 2009). Après interaction avec ces co-récepteurs, le HCV s'internalise par un processus dépendant de la clathrine (Blanchard et al., 2006 ; Meertens et al., 2006). Le trafic de HCV s'arrête dans les endosomes précoces où une baisse du pH déclenche la fusion entre les membranes virale et endosomale (Koutsoudakis et al., 2006 ; Meertens et al., 2006). La nucléocapside est ainsi libérée dans le cytosol de la cellule infectée. La décapsidation du virus n'a pas été décrite à ce stade. Il se peut que la protéine core reste étroitement associée à l'ARN viral et ne soit libérée que lorsque la traduction ou la réplication s'initie. Enfin, il est à noter qu'il existe un transfert direct du HCV de cellule à cellule sans passer par la voie extracellulaire (Timpe et al., 2008 ; Witteveldt et al., 2009). Ce mode de transmission protégerait le virus contre la neutralisation mais les mécanismes impliqués restent mal compris.

IV.1.d. La Fusion

Après l'internalisation, le virion est transporté au niveau des endosomes précoces où a lieu la fusion (*cf partie V.4.c.i. Le processus de fusion*). L'acidification de ces vésicules (Coller KE et al., 2009) ainsi que les glycoprotéines E1 et E2 du HCV (Drummer et al., 2007 ; Haberstroh et al., 2008 ; Lavillette et al., 2007 ; Russell et al., 2009) sont essentielles pour l'étape de fusion. Le rôle des glycoprotéines d'enveloppe du HCV dans ce processus sera détaillé plus loin (*cf partie V.4.c.i. Le processus de fusion*). Le pH optimal pour la fusion observé *in vitro* est d'environ 5,5 dans le modèle et 5,0 pour les HCVcc (Haid et al., 2009 ; Lavillette et al., 2006). Cependant, la fusion peut se produire à des pH plus élevés avec un seuil supérieur de 6,3 (Haid et al., 2009 ; Lavillette et al., 2006), et d'une façon similaire à celle observée pour les flavivirus (Stiasny & Heinz, 2006).

D'autre part, la fusion est dépendante de la température puisque aucune fusion n'a été signalée à 4° C (Lavillette et al., 2006) et elle est facilitée par la présence de cholestérol et la faible concentration d'ApoCI (Dreux et al., 2007 ; Lavillette et al., 2006). Il est à noter que la fusion du virus avec les liposomes ne nécessite aucun récepteur du virus, ce qui est souvent le cas des virus dépendants du pH, mais il est possible que l'incorporation de récepteurs de surface cellulaire dans la membrane des liposomes aboutirait à une fusion beaucoup plus efficace.

Suite à la fusion, le génome du HCV est vraisemblablement libéré dans le cytosol, où il est directement traduit pour synthétiser les protéines virales et commencer la réplication de l'ARN génomique. Il est à noter, qu'au niveau du foie, Les cellules infectées forment des groupes de cellules suggérant ainsi que le virus se transmet de façon directe par contact de cellule à cellule (Wieland et al., 2014).

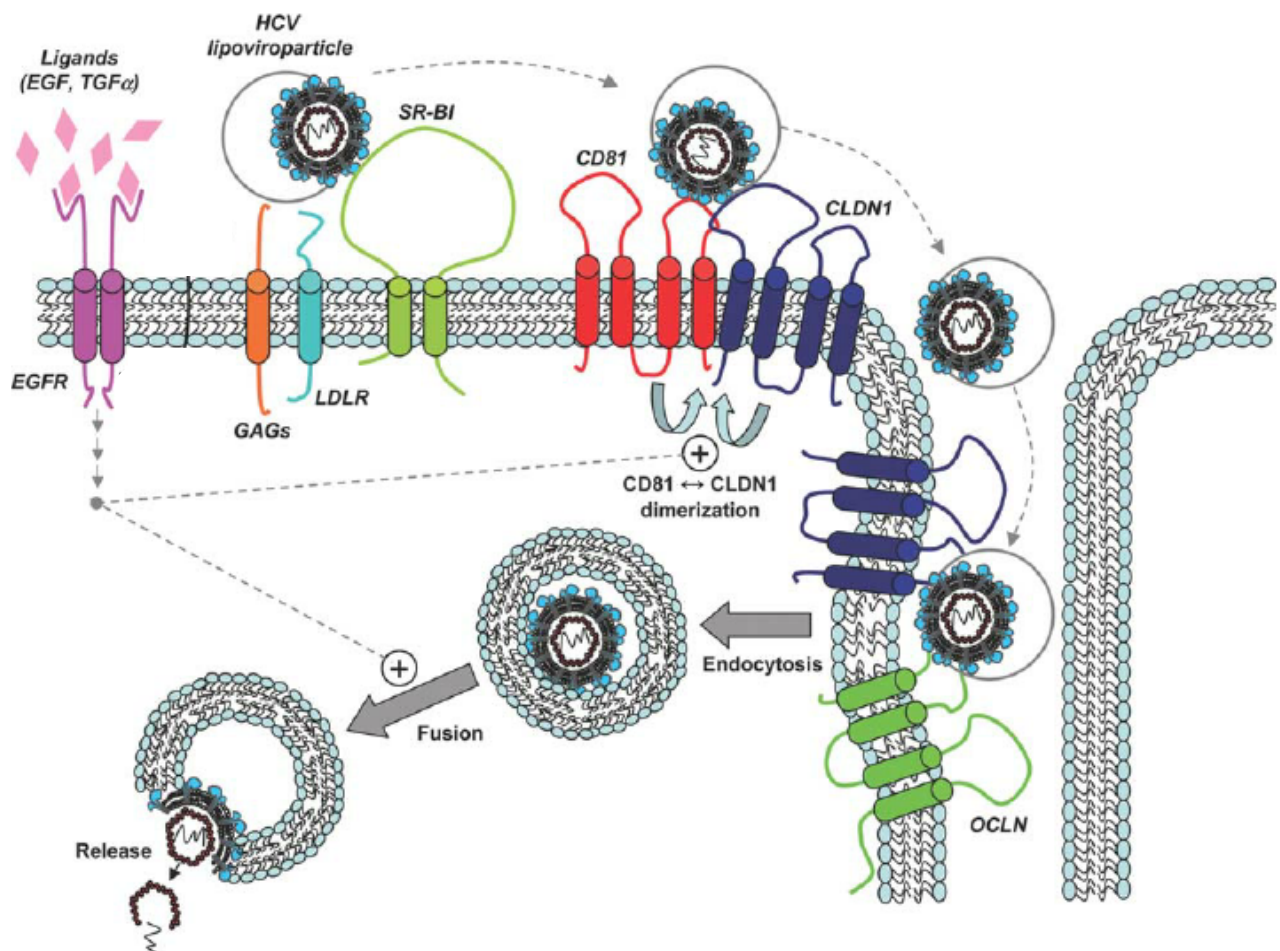


Figure 29. Représentation schématique de l'étape d'entrée du HCV. Les LVPs interagissent avec les GAGs et les LDLr au niveau de la membrane basolatérale des hépatocytes. Après cet attachement initial, les LVPs entrent en interaction avec SR-BI et CD81 ainsi qu'avec CLDN1 et OCLN, protéines de jonction serrées. À ce stade, l'hétérodimérisation de CD81 et CLDN1 rend ce complexe actif et initie le processus d'internalisation. Le virus est ensuite internalisé à l'intérieur de la cellule par un processus dépendant de la clathrine. L'acidification au niveau des endosomes précoces aboutit à la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane endosomale et la libération du génome dans le cytoplasme. L'entrée virale pourrait être favorisée par l'activité du récepteur EGFR, en influençant l'hétérodimérisation entre CD81 et CLDN1 et la fusion au niveau des endosomes (Adapté à partir de McCartney et al., 2011).

IV.2. La traduction du génome viral

Le génome du HCV contient un seul ORF, qui se trouve flanqué par deux (5' et 3') régions non-codantes (NTRs). Ces régions contiennent des structures essentielles pour la réplication et la traduction du génome virale (Lohmann, 2013). La région non codante 5'UTR contient un site IRES, qui initie la traduction du génome virale en une polyprotéine immature et cela en permettant l'interaction entre l'ARN et la sous-unité ribosomale 40S (figure 30). Après l'acquisition de 3 facteurs d'initiation (eIF3, eIF2 et eIF5), il y a formation du complexe ribosomal 80S, ce dernier est responsable de la traduction du génome viral et la synthèse de la polyprotéine. Après clivage post- et co-traductionnel de la polyprotéine par des protéases virales et cellulaires, 10 protéines virales sont produites (core, E1, E2, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, and NS5B) (*cf partie II.4. Les protéines virales*) (Moradpour & Penin, 2013). Les protéines structurales (core, E1 et E2) ainsi que la jonction entre p7 et NS2, sont clivées par une peptidase signal. La protéine NS3 par son domaine peptidase est responsable du clivage entre NS4A et NS4B. La protéine NS4A s'associe ensuite à NS3 pour former le complexe NS3/NS4A responsable des clivages entre NS4B et NS5A ainsi qu'entre NS5A et NS5B. Le clivage entre NS2 et NS3 se fait par le domaine protéase de NS2.

IV.3. La réplication virale

Après leur synthèse, les protéines virales se retrouvent toutes associées à la membrane du RE. Les protéines NS3/4A, NS4B, NS5A, et NS5B sont celles qui forment le complexe de réplication responsable de la transcription de l'ARN positif de virus en un ARN intermédiaire de sens négatif (Lohmann, 2013). La protéine NS5B est l'ARN polymérase dépendant de l'ARN. Elle est donc le moteur de la réplication virale. L'ARN brin négatif nouvellement synthétisé sert ensuite de matrice pour la synthèse d'autres ARN génomiques qui seront ultérieurement assemblés en particules virales infectieuses. Dans les hépatocytes, L'ARN synthétisé est stabilisé par le microARN 122 (miR-122) (Jopling et al., 2005). Ce microARN est abondant dans le foie et il protège l'ARN génomique du HCV de la dégradation par l'exonucléase Xn1 (Li et al., 2013).

La réplication du HCV se fait dans un microenvironnement cellulaire appelé « membranous web » formé essentiellement par des vésicules à double membrane (figure 30). Les sites de réplifications sont formés par des réarrangements de membranes cellulaires (Lohmann, 2013). La protéine membranaire NS4B, a été identifiée comme jouant potentiellement un rôle

important dans la formation des vésicules membranaires au niveau des « membranous web » (Gouttenoire et al., 2010), mais seule la protéine NS5A est capable d'induire la formation des vésicules à double membrane d'un diamètre équivalent à ce qui est observé dans les cellules infectées (Egger et al., 2002 ; Reiss et al., 2011 ; Romero-Brey et al., 2012). Cependant, aucune des protéines non-structurale exprimées seules n'est capable d'induire la formation d'un membranous web complet, suggérant ainsi que les réarrangements des membranes dans les cellules infectées par le HCV nécessitent l'action coordonnée de toutes les protéines du complexe de réplication.

Différents facteurs cellulaires influençant la réplication et la traduction du HCV ont été identifiés (Germain et al., 2014 ; Shulla & Randall, 2012). Un bon nombre de ces facteurs sont impliqués dans le trafic intracellulaire (Berger & Randallet al., 2009). Parmi ceux-ci, on peut citer la PI4KIII (pour Phosphatidyl-Inositol-4-Kinase-III), un facteur cellulaire impliqué dans la réplication du HCV qui a été identifié dans plusieurs criblages à l'aide de banques de siRNA (Berger & Randall, 2009). L'interaction de la PI4KIII avec la protéine NS5A induit l'accumulation du phosphatidylinositol-4-phosphate (PI4P) au niveau du membranous web (Reiss et al., 2011). L'absence de l'activité du PI4KIII ou de l'interaction NS5A-PI4KIII induit un changement dans la morphologie de la membranous web (Reiss et al., 2011, 2013). La ARFGAP1, une GTPase spécifique des protéines ARF, est responsable du maintien d'un microenvironnement enrichi en PI4P en éliminant la PI4P phosphatase Sac1 du site de réplication viral et cela se fait après interaction avec la protéine virale NS5A qui rend la GTPase active (Li et al., 2014). Il a également été rapporté que la formation des vésicules membranaires est bloquée par des inhibiteurs de cyclophiline A, un autre partenaire de NS5A qui est essentiel pour la réplication de l'ARN génomique (Madan et al., 2014). D'une façon très intéressante, les protéines des pores nucléaires ainsi que les facteurs de transport nucléaire sont également impliqués dans la formation de la membranous web (Neufeldt et al., 2013). Parmi les facteurs cellulaires impliqués dans le cycle infectieux du HCV, il a aussi été montré que GBF1 (pour Golgi-specific brefeldin A-resistance guanine nucleotide exchange factor 1), un facteur d'échange nucléotidique des protéines G de la famille Arf (pour ADP Ribosylation Factors) qui régule la dynamique membranaire, est un facteur nécessaire à la réplication de HCV (Goueslain et al., 2010). Des données plus récentes indiquent que GBF1 agit sur le HCV en activant les protéines Arf4 et Arf5 (Farhat et al., 2016). D'autres protéines cellulaires, VAP-A et VAP-B (pour Vesicle-Associated membrane protein-associated Protein A and B), sont également essentielles pour la réplication de l'ARN viral ainsi que le cholestérol qui a

également été trouvé au niveau du membranous web (Paul et al., 2013). En plus du cholestérol, d'autres lipides jouent également un rôle dans la réplication du HCV. Il est de plus important de noter que l'infection par le HCV altère l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme lipidique (Diamond et al., 2010).

Dans le contexte de la réplication du HCV, les gouttelettes lipidiques convergent vers le membranous web. Ces gouttelettes lipidiques sont impliquées dans la réplication virale (Targett-Adams et al., 2008a) et dans la coordination de la synthèse de l'ARN virale et la morphogénèse de la particule (Miyanari et al., 2007). La protéine Rab18, une protéine associée aux gouttelettes lipidiques, semblerait être responsable de l'association de NS5A avec les gouttelettes lipidiques (Salloum et al., 2013). Une autre protéine des gouttelettes lipidiques, la TIP47 (pour Tail-Interacting Protein 47), joue également un rôle dans la réplication virale du HCV en interagissant avec NS5A (Vogt et al., 2013 ; Ploen et al., 2013). Enfin, il est à signaler que la protéine NS5A joue un rôle crucial dans la formation du membranous web et le recrutement de la réplicase aux gouttelettes lipidiques et cela après interaction de NS5A avec plusieurs protéines cellulaires (Eyre et al., 2014).

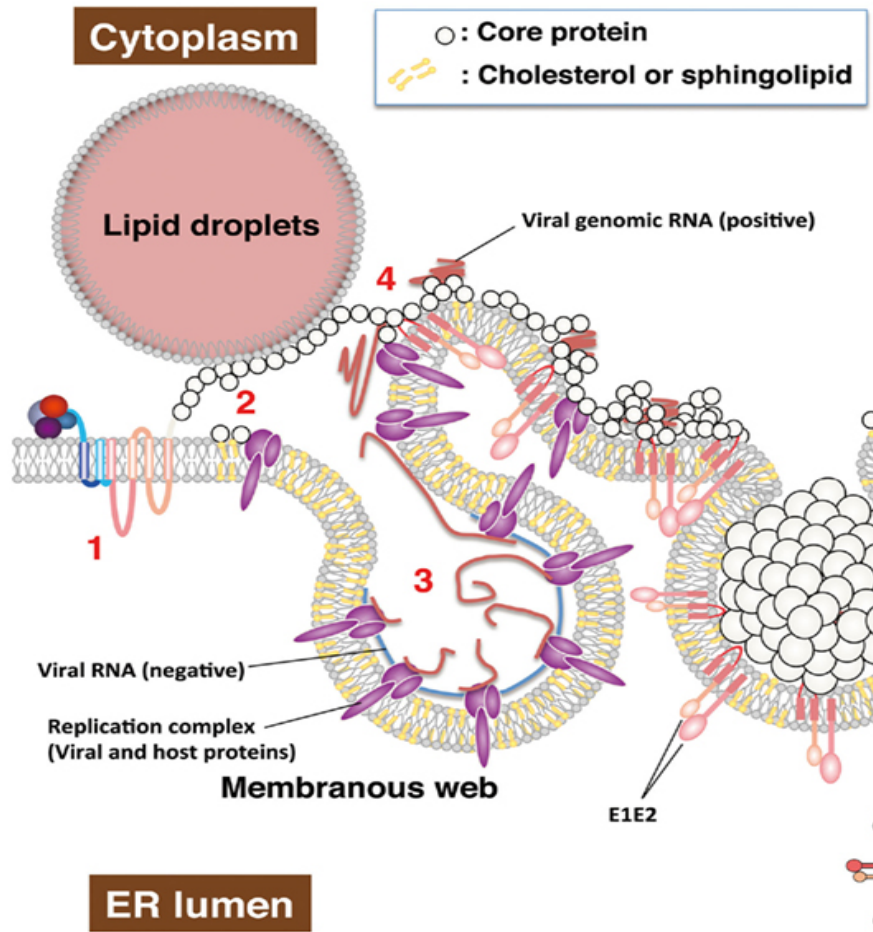


Figure 30. La traduction et la réplication du HCV. La traduction : 1) L'ARN viral décapsidé est traduit en une polyprotéine immature qui après plusieurs clivages d'origine virale et cellulaire aboutit à la formation des protéines virales matures. 2) les protéines virales non-structurales se trouvent insérées dans la membrane du RE. Ensuite, la protéine core est transportée vers les gouttelettes lipidiques. La réplication : 3) La formation de la membranous web, médiée par les protéines NS4B et NS5A, est une étape essentielle pour l'initiation de la réplication virale. Par la suite, lesARN viraux – et + sont synthétisés par le complexe de réplication (RC). 4) L'ARN+ simple brin interagit avec la protéine core pour initier le processus de l'assemblage (Adapté de Moriishi & Matsuura, 2012).

IV.4. L'assemblage et la sécrétion des particules virales

L'assemblage des virions du HCV nécessite la présence de l'ARN génomique et des différentes protéines virales structurales et non structurales au niveau du site d'assemblage, notamment les gouttelettes lipidiques (Miyanari et al., 2007), où elles seront regroupées d'une manière très organisée (Lindenbach, 2013). Ce n'est que depuis la mise au point d'un système de réplication pour le HCV (HCVcc) qu'il est possible d'étudier l'étape d'assemblage viral (Wakita et al., 2005). Une des particularités des virus de la famille des Flaviviridae incluant le HCV est l'implication des protéines virales non structurales dans le processus d'assemblage viral. De plus, la morphogenèse du HCV est intimement liée au métabolisme des lipides cellulaires.

La protéine core est le composant principal de la particule virale et qui après interaction avec l'ARN viral forme la nucléocapside. Après sa synthèse et son repliement, la protéine core forme des homodimères qui seront ultérieurement transportées aux gouttelettes lipidiques (Barba et al., 1997 ; Moradpour et al., 1996) (Figure 31). L'interaction de la protéine core via son domaine C-terminal hydrophobe avec les gouttelettes lipidiques est une étape cruciale pour le recrutement des autres composants de la particule virale au cours de l'assemblage (Miyanari et al., 2007), notamment, l'interaction core-NS5A assure le recrutement de l'ARN dans la particule virale au cours de l'assemblage (Masaki et al., 2008). L'interaction core-gouttelettes lipidiques conduit à des changements dans la localisation cellulaire de celles-ci. Généralement, dans les cellules non infectées, les gouttelettes lipidiques se trouvent réparties dans le cytoplasme, alors qu'après infection par le HCV, ces gouttelettes ont une distribution péri-nucléaire (Boulant et al., 2008). L'interaction core-gouttelettes lipidiques peut être influencée par des protéines cellulaires. En effet, il a été montré que la DGAT1 (pour diacylglycérol acyltransférase-1), une enzyme impliquée dans la morphogenèse des gouttelettes lipidiques, interagit avec la protéine core et facilite l'interaction entre la protéine core et les gouttelettes lipidiques ainsi que la production de virus (Herker et al., 2010). Le recrutement de la protéine core aux gouttelettes lipidiques nécessite également le PLA2G4 (pour MAPK-regulated cytosolic phospholipase A2) (Menzel et al., 2012). De plus, l'IKK- α (pour I κ B kinase- α) a également été montré comme facteur essentiel pour l'assemblage de HCV (Li et al., 2013).

Parmi les protéines virales non structurales, la protéine NS5A est impliquée dans le processus d'assemblage, même si son rôle exact est mal connu. L'équilibre entre les formes hyperphosphorylée et hypophosphorylée de NS5A semble réguler la transition de la réplication vers l'assemblage. Ainsi, la forme hyperphosphorylée est associée à l'assemblage en diminuant l'interaction entre NS5A et l'ARN viral (Masaki et al., 2014). Cette forme de NS5A est capable d'une part d'interagir avec la protéine core via son domaine C-terminal et d'autre part de s'associer au complexe p7-NS2 (Masaki et al., 2008, 2014). D'une manière très intéressante, NS5A est aussi capable d'interagir avec l'ApoE, une apolipoprotéine clé dans l'assemblage et la sécrétion du HCV (Benga et al., 2010 ; Cun et al., 2010).

Un autre composant majeur de la particule virale est le complexe formé par les glycoprotéines d'enveloppe. Les glycoprotéines E1 et E2 du HCV forment un hétérodimère non covalent, qui est retenu dans le RE (Dubuisson et al., 1994). Par la suite, ce complexe glycoprotéique migre à proximité des gouttelettes lipidiques où l'assemblage a lieu (Miyanari et al., 2007). Il a été montré que NS2 interagit avec E1, E2 et p7 et ces interactions sont essentielles pour la migration de l'hétérodimère E1E2 vers le site de l'assemblage des virions (Jirasko et al., 2010 ; Ma et al., 2011 ; Popescu et al., 2011 ; Stapleford et al., 2011). Il a également été montré que l'hétérodimère E1E2, NS2 et p7 forment une unité fonctionnelle qui migre vers les gouttelettes lipidiques (Popescu et al., 2011). La protéine p7 une fois oligomérisée permettrait, par ses propriétés de transport de cations, d'équilibrer le pH dans le compartiment de sécrétion des particules virales et donc d'éviter des changements conformationnels précoces, induits par un pH acide (Wozniak et al., 2010).

En plus des protéines NS5A, p7 et NS2, les autres protéines virales non structurales sont également impliquées dans le processus d'assemblage et de sécrétion. Le complexe NS3/NS4A est également impliqué dans l'encapsidation de l'ARN viral (Ma et al., 2008 ; Yi et al., 2006). Il a été montré que des mutations au niveau du domaine hélicase de NS3 ainsi que dans le domaine C-terminal de NS4A aboutiraient à un défaut dans l'assemblage de la particule virale (Phan et al., 2011 ; Pietschmann et al., 2009). De plus, des études biochimiques ont montré que des interactions entre le domaine hélicase de NS3 et la protéine core sont essentielles pour l'assemblage du virus (Jones et al., 2011 ; Mousseau et al., 2011). Enfin, Il a été montré que les protéines NS4B et NS5B sont également impliquées dans le processus de l'assemblage mais on ne sait pas si elles sont impliquées d'une façon direct ou indirect dans la morphogénèse des virions (Gouklani et al., 2012 ; Jones et al., 2009).

La biogénèse du virion HCV est étroitement liée à la voie d'assemblage des VLDL (figure 31). En effet, les inhibiteurs de la MTTP (pour Microsomal Triglyceride Transfer Protein),

une protéine impliquée dans la biogenèse des VLDL, bloquent la production des particules virales (Gastaminza et al., 2008 ; Huanget al., 2007 ; Nahmias et al., 2008). De plus, l'ACSL3 (pour long chain acyl-CoA synthetase 3), un enzyme impliqué dans l'assemblage des VLDL et le HNF4a (pour hepatocyte nuclear factor 4a), un facteur de transcription qui module la voie de sécrétion des VLDL, sont également responsables de la régularisation de la production des virions, ce qui renforce l'idée que les virions suivent la voie de sécrétion des VLDLs (Li et al., 2014 ; Yao & Ye, 2008). Plusieurs apolipoprotéines (ApoE, ApoB ...) ont été trouvées en association avec la particule virale mature (Bartenschlager et al., 2011 ; Catanese et al., 2013). L'apolipoprotéine ApoE est impliquée dans l'assemblage et la maturation des particules virales (Da Costa et al., 2012 ; Hueging et al., 2014 ; Jiang & Luo, 2009). Des études ont montré que parmi les apolipoprotéines, seule l'apoE est capable d'induire la sécrétion de particules virales infectieuses (Da Costa et al., 2012 ; Hueging et al., 2014). La voie d'ESCRT (pour Endosomal-Sorting Complex Required for Transport), est impliquée dans le processus de bourgeonnement de la particule virale au niveau du RE mais son rôle est mal connu (Ariumi et al., 2011 ; Corless et al., 2010 ; Tamaiet al., 2012). Cette voie est également responsable de la sécrétion des exosomes, contenant de l'ARN virale, à partir des hépatocytes infectées (Dreux et al., 2012). Enfin, après l'assemblage et le bourgeonnement au niveau du RE, les particules virales sont sécrétées par la voie de sécrétion des VLDLs (Coller et al., 2012). Durant cette étape, l'association des particules virales avec différentes apolipoprotéines permet à ces particules d'acquérir leur faible densité avant qu'elles soient sécrétées par exocytose (Gastaminza et al., 2006 ; 2008).

IV.5. Transmission cellule - cellule

Il existe deux voies de transmission du virus à de nouvelles cellules hépatocytaires : la voie d'entrée décrite précédemment et la voie de transmission de cellule à cellule (Timpe et al., 2008). Ce dernier mode de transmission est le mode d'infection utilisé préférentiellement par les virus résistants aux thérapies utilisant des molécules ciblant directement le virus (les DAAs) (Xiao et al., 2014) et est aussi une des alternatives utilisées par le HCV pour échapper aux anticorps neutralisants. Les protéines SR-BI, CLDN1 et OCLN sont importantes au cours de ce mode de transmission entre les hépatocytes (Timpe et al., 2008) alors que, le rôle de CD81 est controversé (Brimacombe et al., 2011 ; Timpe et al., 2008).

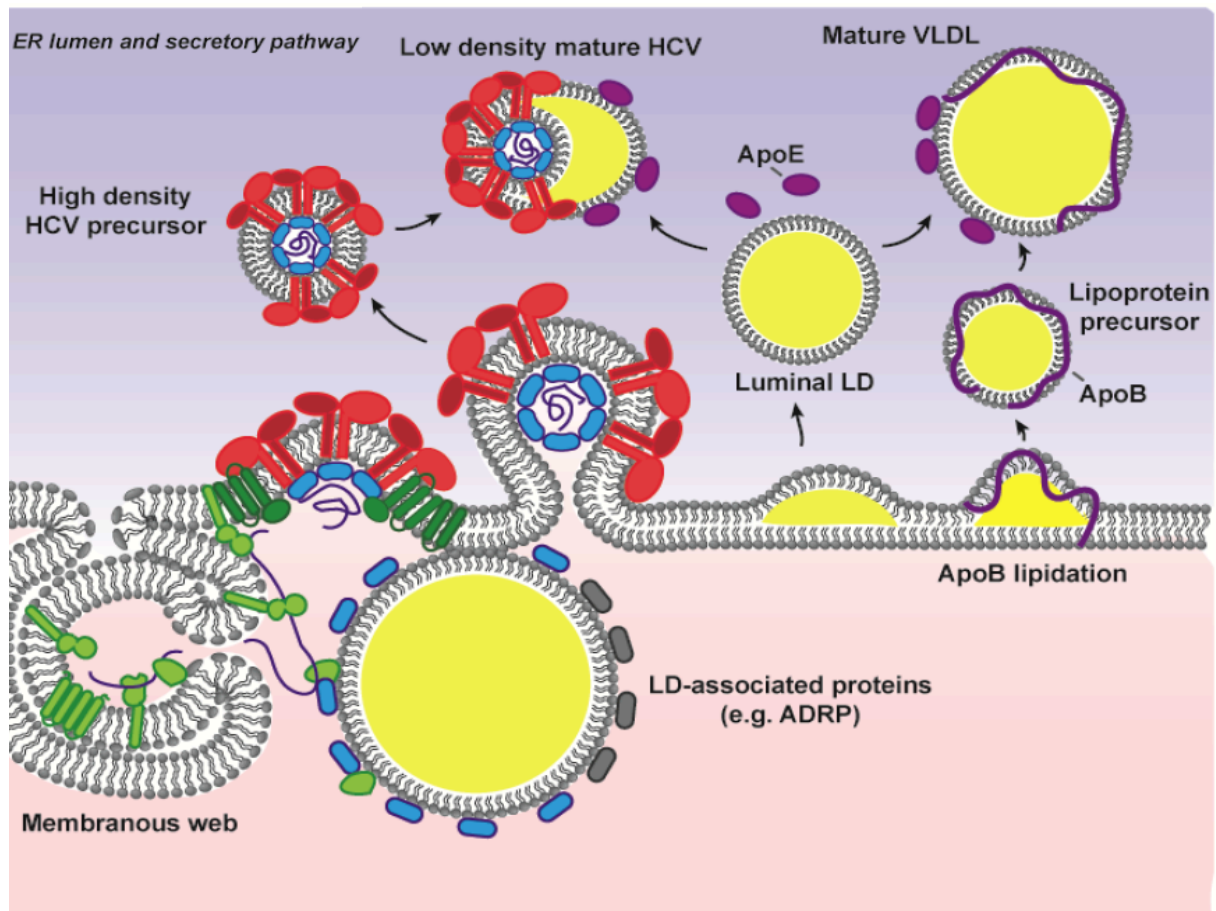


Figure 31. Représentation schématique des étapes de l'assemblage et de la sécrétion des particules virales du HCV. Assemblage : après clivage et maturation de la protéine core, cette dernière sera transportée vers les gouttelettes lipidiques par une protéine nommée DGAT1. La liaison core-gouttelettes lipidiques d'une part et le complexe de réplication d'autre part forme le site d'assemblage du virus. L'ARN synthétisé, après réplication, est transféré vers le site d'assemblage par le complexe NS3/4A ou NS5A. Ensuite, les glycoprotéines E1 et E2 interagissent avec la protéine core et avec le complexe de réplication via les protéines p7 et NS2. L'étape de bourgeonnement commence par l'encapsidation de l'ARN viral au niveau du RE. Maturation et sécrétion : l'interaction des virions avec les lipoprotéines au cours de l'étape de sécrétion est essentielle pour la maturation de la particule virale. En effet, la liaison à l'ApoE d'une part et la fusion avec les gouttelettes lipidiques dans la lumière du RE d'autre part constituent deux étapes cruciales pour la maturation des virions et l'acquisition de leur faible densité. Enfin, ces virions seront sécrétés à l'extérieur de la cellule par exocytose (Adapté de Vieyres et al., 2014).

V. Les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2

V.1. Biogenèse de E1 et E2

V.1.a. Synthèse, et déterminants de l'hétérodimère E1E2

Les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 sont deux protéines transmembranaires (TM) de type I hautement glycosylées, ayant chacune un ectodomaine N-terminal de 160 et 330 acides aminés, respectivement, et un domaine C-terminal d'environ 30 acides aminés. E1 et E2 sont adressées au RE grâce aux séquences signal internes présentes dans la région C terminale de la protéine située en amont sur la polyprotéine. De cette manière, la région C terminale de la protéine Core contient le peptide signal de E1 et la partie C terminale de E1 correspond au peptide signal de E2 (*cf figure 9*). Suite à la traduction de la polyprotéine virale, la protéine E1 est libérée par clivage simultané de la jonction Core/E1 et E1/E2 par un signal peptidase cellulaire (*cf figure 9*). Un dernier clivage à la jonction E2/p7 permet de libérer la protéine E2. Cependant, les clivages des jonctions E2/p7 et p7/NS2 sont retardés, conduisant à l'existence de précurseurs E2-p7-NS2 dans les cellules infectées (Dubuisson et al., 1994 ; Grakoui et al., 1993 ; Lin et al., 1994). Ces intermédiaires ne semblent pas être indispensables au cycle du virus (Jones et al., 2007). Au cours de leur synthèse les ectodomains de E1 et E2 sont transloqués dans la lumière du RE et leur domaines transmembranaires (TMDs) sont insérés dans la membrane. E1 et E2 s'assemblent sous forme d'hétérodimères non covalents. Leurs domaines transmembranaires contiennent deux séries d'acides aminés hydrophobes séparés par au moins un résidu polaire conservé. Ces domaines contribuent à l'ancrage membranaire, à la rétention dans le RE et à l'hétérodimérisation des protéines E1 et E2 (Cocquerel et al., 2000 ; Vieyres et al., 2014). En plus des TMDs, d'autres régions des ectodomains de E1 et E2 participent à l'interaction entre E1 et E2 (Albecka et al., 2011 ; Douam et al., 2014 ; Drummer & Pountourios, 2004). La formation de l'hétérodimère E1E2 est un processus lent et complexe. Les repliements des glycoprotéines E1 et E2 sont interdépendants et nécessitent la contribution des protéines chaperonnes du RE comme la calnexine et la protéine disulfide isomérase (Lavie et al., 2007). Cependant, E2 peut être exprimé seul et présenter une structure native reconnue par les anticorps conformationnels et capable de se lier aux récepteurs cellulaires du HCV (Heile et al., 2000). L'expression de E1 et E2 dans les cellules Caco-2 polarisées et HepG2 conduit à leur association avec les lipoprotéines et leur sécrétion dans le milieu extracellulaire (Icard et al., 2009). Par ailleurs, il existe des incompatibilités

intergénomiques entre les protéines E1 et E2 de différents génotypes. Ainsi, la caractérisation de virus HCVcc présentant des hétérodimères chimériques a révélé que certaines combinaisons de génotypes sont non fonctionnelles pour l'entrée du virus (Albecka et al., 2011 ; Carlsen et al., 2013 ; Douam et al., 2014 ; Maurin et al., 2011).

V.1.b. Repliement, glycosylation et formation des ponts disulfures

La maturation des glycoprotéines d'enveloppe a lieu dans le RE. Elle implique la formation de ponts disulfures par les PDI (pour Protein Disulfide Isomerase) et la glycosylation de la protéine par la machinerie de N-glycosylation.

V.1.b.i. La glycosylation

Les N-glycanes représentent le tiers de la masse des glycoprotéines d'enveloppe du HCV avec 4 N-glycanes confirmés sur E1 et 11 sur E2 (figure 32). Malgré la grande variabilité génétique du virus, la majorité des sites de glycosylation de E1 et E2 sont bien conservés chez les différents génotypes (Goffard et al., 2005 ; Helle et al., 2007). Cela suggère un rôle important pour ces sucres dans le cycle viral. Ainsi, des études de mutagenèse dirigée ont révélé que ces glycanes étaient cruciaux pour l'assemblage et l'infectiosité du virus. Ils modulent l'hétérodimérisation de E1 et E2, leur repliement, leur interaction avec les récepteurs et les anticorps neutralisants ainsi que la fusion du virus (Helle et al., 2010). La N-glycosylation débute dans le RE avec l'ajout de glycanes sur la chaîne polypeptidique en cours de synthèse. Les différents procédés de modification des glycanes dans le RE conduisent à une diversité limitée. Ainsi, les glycanes obtenus portent des ramifications exclusivement composées de résidus mannoses (high-mannose glycans). Dans l'appareil de Golgi, une diversification structurale est introduite conduisant à la formation de glycanes complexes. Ainsi, la nature des glycanes renseigne sur le trafic cellulaire de la protéine lors de sa biogenèse. Du fait de leur transit par l'appareil de Golgi, les glycoprotéines E1E2 associées aux HCVcc présentent des glycanes de type oligomannosidique et complexe. Par contre, dans le contexte des HCVpp, E1 et E2 présentent principalement des glycanes de type-complexe. Ce résultat souligne l'existence de différences dans les processus d'assemblage dans ces deux systèmes (Vieyres et al., 2010).

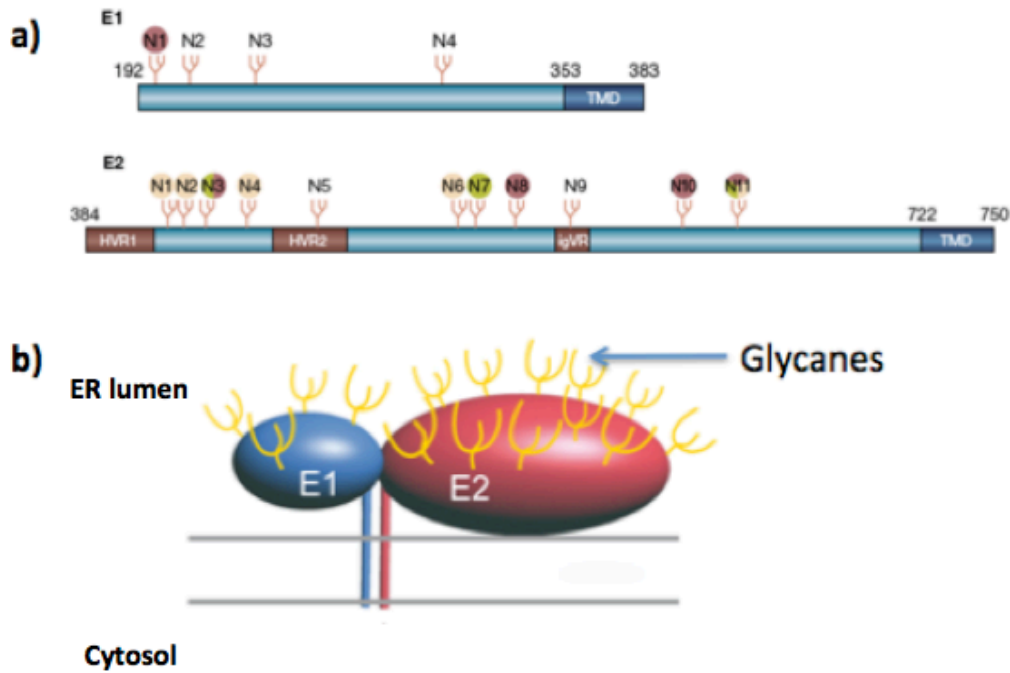


Figure 32. Les glycoprotéines E1 et E2. a. Les sites de glycosylations sur les glycoprotéines d'enveloppe du HCV (Helle et al., 2009). b. Représentation schématique de l'hétérodimère E1-E2 sur la surface de la particule virale (Voisset & Dubuisson, 2004).

V.1.b.ii. La formation des ponts disulfures

Les ectodomains des protéines E1 et E2 contiennent de nombreux résidus cystéine qui forment des ponts disulfures dans l'environnement oxydant du RE. Dans les systèmes d'expression hétérologue, une grande partie des protéines E1 et E2 suit un processus de repliement non productif et forme des agrégats mal repliés, stabilisés par des liaisons disulfures intermoléculaires. Le processus de repliement conduisant à l'obtention d'un hétérodimère fonctionnel est lent et assisté par la protéine chaperonne calnexine. De plus, il nécessite une assistance réciproque de E1 et E2. Dans ce contexte, les protéines E1 et E2 forment des hétérodimères non covalents et les cystéines sont engagées dans des ponts disulfures intramoléculaires (Lavie et al., 2007). Ces formes fonctionnelles de E1 et E2 sont reconnues par des anticorps conformationnels (Cocquerel et al., 2003 ; Deleersnyder et al., 1997 ; Dubuisson & Rice, 1996). Dans le système HCVpp, les cellules produisent des hétérodimères fonctionnels et des agrégats non fonctionnels, mais les particules de HCVpp intègrent principalement les complexes fonctionnels correspondant aux hétérodimères non covalents (De Beeck et al., 2004 ; Flint et al., 2004).

A l'inverse, les protéines E1 et E2 associées aux particules HCVcc forment de grands complexes connectés par des ponts disulfures (Vieyres et al., 2010). Ces liaisons covalentes sont susceptibles de contribuer à la résistance de la particule aux faibles pH. Ce résultat suggère qu'un réarrangement des liaisons disulfures est nécessaire pour induire la fusion à pH acide (Tscherne et al., 2006).

De manière inattendue, la mutation individuelle des cystéines de E1 atténue seulement l'infectiosité du virus alors que la mutation individuelle des cystéines de E2 inactive le virus (McCaffrey et al., 2012 ; Wahid et al., 2013).

V.2. Organisation globale et structure

Parmi les deux glycoprotéines E1 et E2, E2 est actuellement la mieux caractérisée. Elle constitue la protéine de liaison aux récepteurs cellulaires et la cible majeure des anticorps neutralisants. L'interaction directe de E2 avec les récepteurs cellulaires CD81 et SR-BI a pu être mise en évidence. La glycoprotéine possède plusieurs régions hypervariables (HVR). Les 27 résidus N-terminaux de la protéine constituent la région hypervariable 1 (HVR1 ; 384-410 aa.). Cette région est la cible d'anticorps neutralisants et est de ce fait soumise à une forte pression sélective. La région hypervariable 2 (HVR2 ; 461-481a.a) est flanquée par des résidus cystéines conservés qui forment une liaison disulfure exposée à la surface de la protéine. HVR3 (434-450 a.a.) recouvre une région immunogène de E2 (épitope II) ciblée par certains anticorps neutralisants (Lapierre et al., 2011). La quatrième région hypervariable, appelée IgVR (pour Intergenotypic Variable Region) s'étend des résidus 570 à 580 (McCaffrey et al., 2007). Cette région est relativement conservée au sein d'un même génotype mais présente une importante variabilité d'un génotype à l'autre. HVR2 et IgVR sont importantes pour l'hétérodimérisation de E1 et E2 et pour l'infectiosité du virus (McCaffrey et al., 2011). Les trois régions, HVR1, HVR2 et IgVR, peuvent être supprimées dans une forme soluble de E2 sans affecter le repliement global de la glycoprotéine E2 (McCaffrey et al., 2007). Cependant, la délétion de ces trois régions entraîne une perte d'infectiosité (Bankwitz et al., 2010 ; Forns et al, 2000 ; McCaffrey et al., 2011).

La région contenant les sites de liaison aux récepteurs du virus (a.a résidus 384-661) est connectée au domaine transmembranaire par un segment d'environ 30 aa (aa résidus 716-746). Ce dernier contient une série de répétitions en heptade (résidus 675-699) qui s'est avéré important pour l'hétérodimérisation de E1 et E2 et pourrait être impliqué dans la

réorganisation du complexe E1E2 lors du processus de fusion (Albecka et al., 2011; Drummer & Pountourios, 2004; Perez-Berna et al., 2006).

Pendant longtemps, la caractérisation structurale de E1 et E2 a été limitée par les difficultés rencontrées lors des tentatives d'expression et de purification des protéines dans leur forme native. La plupart des virus de la famille des *Flaviviridae* possèdent des protéines de fusion de classe II. Ainsi, en l'absence de données cristallographiques, il avait été proposé que le HCV possédait le même type de protéine de fusion que les membres de sa famille. Plus récemment, la structure cristallographique de l'ectodomaine de la protéine E2 a été déterminée par deux groupes de chercheurs (Khan et al., 2014 ; Kong et al., 2013). Dans les deux cas, des formes tronquées solubles de l'ectodomaine exprimées sans E1 ont pu être cristallisées. Contrairement à ce qui a été suggéré précédemment (Krey et al., 2010), cette protéine ne présente pas l'organisation en trois domaines caractéristique des protéines virales de fusion de classe II. En effet, E2 présente une structure globulaire contenant de nombreuses régions sans structures secondaires particulières (456-491 a.a.). Elle possède un domaine central de type immunoglobuline constitué par un sandwich de feuillets β (résidus 492 à 566 a.a.). Ce domaine est flanqué à l'avant et à l'arrière par deux couches contenant des boucles, de courtes hélices α et des feuillets β (Figure 33-B). Les deux structures présentent les mêmes ponts disulfures. De plus l'étude de Kong a permis de localiser la région d'interaction avec le récepteur cellulaire CD81 dans la partie avant (« front layer ») de la protéine.

Ces données structurales indiquent que E2 ne présente pas les caractéristiques structurales des protéines de fusion, ce qui suggère que E1 seul ou en association avec E2 pourrait être responsable de l'étape de fusion (*cf partie V.4.c.v. Caractérisation de la structure de E1 et E2 et implication dans le processus de fusion*). Cependant, les données structurales concernant l'ectodomaine de E1 sont encore trop limitées pour étayer cette hypothèse.

En ce qui concerne la glycoprotéine E1, seule la structure cristallographique de la région N-terminale comprenant les acides aminés 192 à 270 a été décrite (El Omari et al., 2014). Cette structure partielle a révélé un réseau complexe d'homodimères covalents. La structure de la région N-terminale d'un monomère de E1 consiste en une épingle à cheveux β (résidus 192-205) (β 1- β 2, figure 34) suivie d'une hélice α de 16 acides aminés (résidus 208-223) (α 1, figure 34) flanquant un feuillet β de trois brins antiparallèles (β 3, β 4 et β 5). Dans ce feuillet β , la boucle entre les brins β 4 et β 5 contient 10 résidus désordonnés.

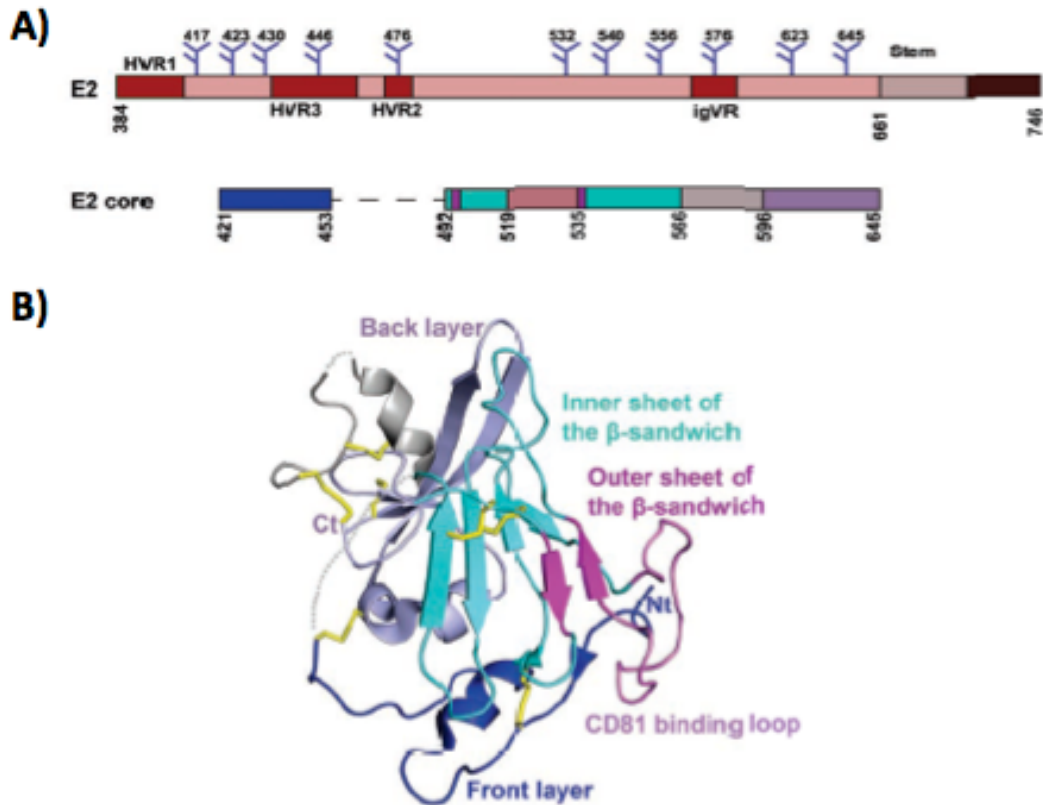


Figure 33. Structure cristallographique de la glycoprotéine E2 du HCV. A) Représentation schématique de l'ectodomaine de la protéine E2. B) la glycoprotéine E2 du HCV colorée par les principaux composants structuraux: le feuillet interne β -sandwich, le feuillet externe du β -sandwich et le site de liaison au récepteur CD81 (519-535 a.a). Les ponts disulfures sont représentés sous forme de bâtonnets jaunes. Les régions désorganisées sont indiquées en pointillés.

En plus de la caractérisation structurale de la région N-terminale de E1, une étude par RMN a également été réalisée sur un peptide situé dans la région C-terminale de l'ectodomaine E1 (aa 314-342). Cette étude a révélé la présence de 2 autres hélices α (α_2 et α_3 , Figure 34). Ce peptide a la capacité d'interagir avec les membranes, ce qui suggère qu'il peut interagir soit avec la membrane de l'enveloppe virale lors de l'assemblage, soit avec la membrane de l'hôte pendant l'étape de fusion (Spadaccini et al., 2010). Plus récemment, une équipe a co-cristallisé le fragment Fab d'un anticorps monoclonal humain dirigé contre E1 (IGH526) avec un composant majeur de son épitope (a.a 314-324). Ces données ont confirmé que ce peptide adoptait une structure hélicoïdale correspondant à l'hélice α_2 (Kong et al., 2015) (figure 34). Enfin, des études par RMN du domaine TM de E1 ont montré que ce domaine adoptait une conformation hélicoïdale, avec des étirements hélicoïdaux au niveau des résidus 354-363 et 371-379 séparés par un segment plus flexible entre les résidus 364-370 (α_4 et α_5 , figure 34) (De Beeck et al., 2000 ; Zazrin et al., 2014).

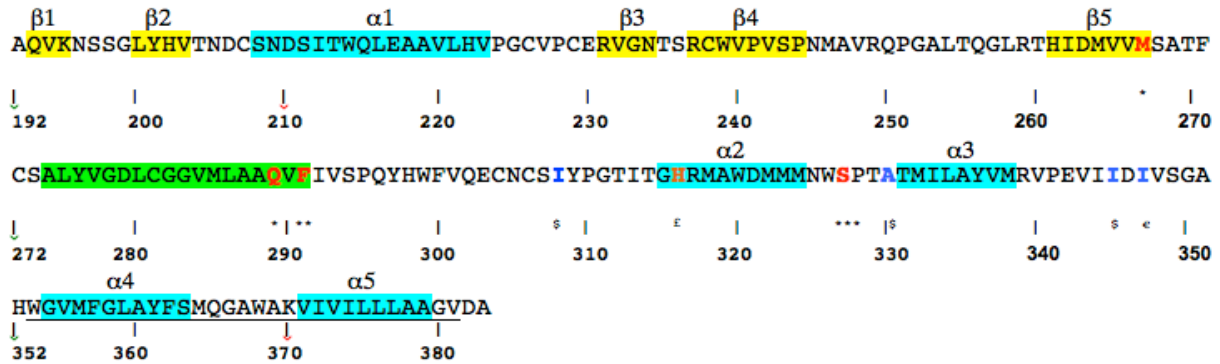


Figure 34. La séquence et les caractéristiques structurales identifiées dans E1. Cette figure montre la séquence de E1 de l'isolat JFHI avec l'épitope A4 (spécifique du génotype 1a) ajouté à son extrémité N-terminale (aa 197-207). Le domaine TM est souligné et le potentiel peptide de fusion est coloré en vert. Les résidus impliqués dans les interactions croisées de E1 avec la glycoprotéine E2 sont indiqués en bleu: (\$), (€). Les résidus identifiés avec des mutations résistantes à des inhibiteurs d'entrée et susceptibles d'affecter la fusion sont indiqués en rouge: (*), (**), (***)). La position d'une mutation conduisant à un changement de dépendance de CLDN1 à CLDN6 est indiquée en orange (£).

V.3. Les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 et la neutralisation virale

Le rôle des anticorps neutralisants est de bloquer l'entrée du virus dans les cellules hôtes en ciblant les glycoprotéines de l'enveloppe virale. Ils peuvent également bloquer différentes étapes de l'entrée en inhibant l'internalisation ou les changements de conformation nécessaires lors de l'étape de fusion. Ils exercent une forte pression de sélection sur le virus, ce qui conduit à l'apparition de mutants de résistance.

Avant l'établissement du système HCVpp en 2003 (Bartosch et al., 2003a, 2003c ; Hsu et al., 2003), les anticorps ont été principalement testés pour leur capacité à neutraliser l'étape d'attachement qui ne correspond pas toujours à leur véritable capacité de neutralisation. Les anticorps polyclonaux dérivés d'animaux infectés expérimentalement ou de patients naturellement infectés par le HCV, permettent d'évaluer l'importance de l'activité de neutralisation anti-HCV *in vivo*. Les anticorps monoclonaux permettent d'étudier en détail les étapes du cycle infectieux et d'identifier les épitopes impliqués dans la neutralisation.

V.3.a. Les épitopes neutralisants de E2

Comme mentionné précédemment, la protéine E2 est la principale cible de la réponse immunitaire humorale. Plusieurs régions de E2 sont ciblées par des anticorps neutralisants.

Les 27 premiers résidus de E2 qui correspondent à HVR1 constituent une région immunogène. Cette région joue d'importants rôles dans l'interaction de E2 avec le récepteur SR-BI, l'assemblage et la sécrétion des particules virales et les capacités d'adaptation du virus (Bankwitz et al., 2010, 2014 ; Prentoe et al., 2014). HVR1 présente une grande variabilité et de ce fait, les anticorps ciblant cette région présentent une faible capacité à neutraliser une large gamme de génotypes (Wang et al., 2011). Par ailleurs, des études ont révélé que des virus dépourvus de cette région étaient plus sensibles à la neutralisation par des anticorps neutralisants ciblant le site de liaison à CD81. Ces données suggèrent que HVR1 masque le site d'accès à CD81 sur E2.

Les anticorps neutralisants à large spectre ciblent préférentiellement des épitopes conformationnels conservés et pour la plupart inhibent l'interaction entre E2 et le récepteur CD81. Les anticorps ciblant le site de liaison à CD81 reconnaissent soit des épitopes linéaires situés entre les a.a 412 et 423, des épitopes conformationnels dans la région 523 à 535 soit des épitopes à cheval sur ces deux régions.

Le premier groupe inclut des anticorps comme AP33 et 3/11 qui reconnaissent des épitopes linéaires de la région 412 à 423, appelée épitope I (Zhang et al., 2007). Cette région située en aval d'HVR1 est très conservée. Plusieurs autres anticorps monoclonaux ciblant cette région ont été décrits récemment. Parmi eux, H77.39 neutralise un large spectre de génotypes et bloque la liaison de E2 à CD81 et SR-BI (Owsianka et al., 2006). La structure des complexes formés par l'épitope de E2 et plusieurs de ces anticorps monoclonaux a pu être obtenue (Kong et al., 2012a, 2012b ; Potter et al., 2012 ; Sabo et al., 2011). De manière intéressante le résidu W420 qui est important pour l'interaction avec CD81, est en contact avec tous les anticorps monoclonaux ciblant la région 412-423. Cependant, des études réalisées sur des sérums de patients infectés ont révélé une faible prévalence des anticorps ciblant cette région (Tarr et al., 2007).

Le segment de E2 situé entre les résidus 523 et 535 présente plusieurs résidus conservés qui sont la cible d'anticorps neutralisants à large spectre. De plus, cette séquence est immunogène dans le contexte de l'infection *in vivo* (Ball et al., 2014).

Enfin, la troisième classe d'anticorps cible des épitopes chevauchant les régions 412-423 et 523-535. Cela suggère que ces deux régions sont spatialement proches sur la protéine E2 associée au virus (Perotti et al., 2008).

Le site de liaison à CD81 est fortement conservé et est relativement résistant à l'émergence de mutations d'adaptation (Keck et al., 2011 ; Owsianka et al., 2006). Ces propriétés font de cette région une cible prometteuse pour le criblage d'anticorps thérapeutiques.

Les régions antigéniques 4 et 5 ont pu être identifiées en dehors de la région d'interaction avec CD81 par criblage de banques d'anticorps obtenus à partir d'échantillons de patients (Clementi et al., 2012 ; Giang et al., 2012). Parmi les anticorps monoclonaux ciblant ces régions, AR4A qui reconnaît un épitope discontinu sur E1 et E2, présente un large spectre de neutralisation et peut limiter la progression de l'infection *in vivo*.

Une autre région antigénique de E2 s'étend des résidus 427 à 446 et constitue l'épitope II (Zhang et al., 2007). Cette région est également impliquée dans l'interaction de E2 avec CD81. L'épitope II peut être la cible d'anticorps neutralisants et non neutralisants. Les structures des complexes formés par cet épitope avec un anticorps neutralisant (mAb#8 ; Deng et al., 2013) ou non neutralisant (mAb#12 ; Deng et al., 2014) ont été obtenues. Ces données ont mis en évidence des différences d'organisation spatiale des régions N- et C-terminales de cet épitope en fonction du type d'anticorps associé (Deng et al., 2014). Ainsi, la production d'anticorps neutralisants ou non neutralisants dirigés contre l'épitope II *in vivo* pourrait dépendre des transitions entre les différentes structures adoptées par cet épitope au cours du cycle viral.

V.3.b. Les épitopes neutralisants de E1

La glycoprotéine E1 est moins immunogène que E2 et son rôle dans l'entrée n'est toujours pas clair. Cependant, E1 contient des épitopes neutralisants. En effet, les immunoglobulines G polyclonales, obtenues chez les souris immunisées, se lient à la protéine d'enveloppe E1 et neutralisent l'infection des génotypes 1 à 3 (Dreux et al., 2006 ; Pietschmann et al., 2006).

L'anticorps monoclonal H-111 humain (Keck et al., 2004b) qui englobe les résidus 192-202, et qui dérive d'un patient infecté chroniquement, interagit avec E1 de plusieurs génotypes (1 à 3). Cependant il présente une faible capacité à neutraliser le virus (Dreux et al., 2006 ; Gal-Tanamy et al., 2008). Par ailleurs, les anticorps monoclonaux humains IGH505 et IGH526, qui ciblent les résidus 313 à 327 de E1 neutralisent l'infection des HCVpp de tous les génotypes, à l'exception du génotype 3a ainsi que celle des HCVcc de génotype 1a et 2a (Haberstroh et al., 2008 ; Meunier et al., 2008).

En plus des anticorps conformationnels neutralisants cités précédemment, l'anticorps conformationnel AR5A reconnaît un épitope chevauchant E1 et E2 (Giang et al., 2012). Cet anticorps qui présente d'importantes capacités de neutralisation entre en compétition avec l'anticorps anti-E2 CBH-7 qui cible les mêmes résidus de E2 (541 à 549 a.a.).

V.4. Fonctions de E1 et E2

L'enveloppe des virus enveloppés leur permet de traverser les bicouches lipidiques sans altérer l'intégrité des membranes de la cellule hôte. Cette stratégie favorise une propagation efficace du virus. Les protéines d'enveloppe du virus sont en première ligne du processus d'infection puisqu'elles médient l'entrée du virus dans les cellules. Cette étape nécessite l'interaction du virus avec des récepteurs cellulaires spécifiques et la fusion entre les membranes cellulaire et virale. L'enveloppe virale contient habituellement plusieurs protéines, cependant, chez de nombreux virus, la même protéine d'enveloppe peut fonctionner à la fois comme protéine de liaison aux récepteurs et protéine de fusion (par exemple la protéine E des flavivirus) (Anderson et al., 1992; Chen et al., 1997 ; Rey et al., 1995 ; Skehel & Wiley, 2000). D'autres virus utilisent deux protéines d'enveloppe distinctes et spécialisées qui s'associaient au niveau de l'enveloppe virale (par exemple les alphavirus E1 et E2, paramyxovirus F et HN) (Kielian et al., 2010). Les protéines de d'enveloppe du HCV E1 et E2 jouent un rôle essentiel à différentes étapes du cycle viral, lors de l'entrée et de l'assemblage des particules virales.

V.4.a. Assemblage

Les protéines d'enveloppe virale jouent généralement un rôle majeur dans l'assemblage et, en fonction des familles de virus, peuvent également agir au niveau de l'étape de bourgeonnement du virus (Welsch et al., 2007). L'encapsidation consiste à envelopper la nucléocapside du virus dans une bicouche lipidique contenant les glycoprotéines virales. Le bourgeonnement correspond à la libération de la nouvelle particule virale de la cellule infectée. Cela peut avoir lieu au niveau de la membrane plasmique ou au niveau de membranes intracellulaires (enveloppe nucléaire, RE, endosomes, appareil de Golgi). Dans ce dernier cas, la sécrétion de virus dépendra de la voie de sécrétion de la cellule. Les forces motrices pour initier le bourgeonnement du virus dépendent des glycoprotéines virales et des protéines de capsid.

En ce qui concerne le HCV, la caractérisation détaillée de l'assemblage du virus est limitée par la faible efficacité de cette étape, ce qui complique la réalisation d'études en cellules vivantes par des méthodes de microscopie à haute résolution. Cependant, cette étape implique le recrutement coordonné du complexe E1E2, de la nucléocapside et de plusieurs autres facteurs cellulaires et viraux. Comme chez les autres membres de la famille des *Flaviviridae*, l'assemblage du virus implique des protéines structurales et non structurales (*cf partie IV.4. L'assemblage et la sécrétion des particules virales*).

Le développement des systèmes HCVcc et HCVpp a permis de distinguer les effets des mutations dans E1E2 sur l'assemblage du virion de ceux sur l'entrée virale. Les glycoprotéines d'enveloppe du HCV sont nécessaires à l'enveloppement du virus (Wakita et al., 2005). De plus, des virus chimériques présentant des glycoprotéines de génotype différents de celui du reste des protéines virales sont déficients pour l'enveloppement de la nucléocapside. Cela suggère qu'une interaction entre les protéines d'enveloppe et d'autres facteurs viraux est nécessaire pour cette étape d'assemblage du virus (Steinmann et al., 2013). Par ailleurs, des éléments des protéines d'enveloppe modulent la composition lipidique de la particule virale. En effet, la suppression de la région HVR1 conduit à la production de virions infectieux qui présentent une densité plus élevée que le virus de type sauvage (Bankwitz et al., 2010 ; Prentoe et al., 2011). En outre, ce mutant est plus sensible à l'inhibition par les anticorps neutralisants.

V.4.b. Interactions avec les récepteurs

L'entrée du HCV dans les hépatocytes est un processus complexe qui mobilise un grand nombre de facteurs cellulaires. Cependant, une interaction directe avec E2 a pu être observée seulement avec les récepteurs CD81 et SR-BI.

Plusieurs domaines de la protéine E2 sont impliqués dans l'interaction avec CD81 qui dépend du repliement correct de E2. De plus, la plupart des anticorps neutralisants ciblent ces sites de liaison. Ainsi, la caractérisation des sites de liaison aux anticorps neutralisants par mutagenèse dirigée a permis l'identification de plusieurs domaines cruciaux dans E2 qui sont impliqués dans l'interaction avec CD81 (revue dans Fénéant et al., 2014). Au moins trois régions de E2 interagissent directement avec CD81, mais d'autres régions peuvent moduler cette interaction. La première région proposée se trouve dans HVR2 et s'étend des résidus 474 à 494. La deuxième région potentielle de liaison de E2 s'étend des résidus 522 à 551 et la dernière région correspond aux résidus 612 à 620 (Fénéant et al., 2014). De plus, des études de

microscopie électronique à partir des protéines E2 et CD81 purifiées ont montré que CD81 interagissait directement avec plusieurs acides aminés dans le feuillet externe de E2 (aa 427-430 et 442-444) et dans la boucle de liaison à CD81 (y compris aa 525 dans la région aa 522-551) (Kong et al., 2013). En accord avec ces résultats, l'ectodomaine de E2 qui ne contient pas le domaine de liaison à CD81 n'interagit pas avec ce récepteur (Khan et al., 2014). La délétion d'une partie de la région 474-492 dans E2 n'empêche pas son interaction avec CD81 indiquant ainsi que cette région n'est pas directement impliquée dans la liaison à CD81. De manière similaire, le segment 612-619 n'est pas localisé sur la même face que la région de liaison à CD81 et forme une hélice alpha qui pourrait être cruciale pour la structure de E2 (Kong et al., 2013). Ainsi, cette région pourrait être impliquée de manière indirecte dans l'interaction E2/CD81.

Plusieurs régions de E2 modulent l'interaction de E2 et CD81. Ainsi, la délétion de HVR1 et différentes mutations ponctuelles (G451R, V514A) renforcent l'interaction avec CD81 tout en réduisant la dépendance du virus au récepteur SR-BI pour l'entrée (Grove et al., 2008 ; Lavie et al., 2014). D'autre part, le récepteur SR-BI lie une forme soluble de E2 (sE2) en interagissant avec HVR1 (Scarselli et al., 2002). Des données expérimentales suggèrent que cette interaction induit des réarrangements dans E2 permettant ainsi l'exposition du domaine de liaison à CD81.

Aucune interaction directe entre E1 et les récepteurs cellulaires du virus n'a été décrite à ce jour. Cependant, une étude par mutagenèse dirigée des résidus cystéine conservés dans E1 a montré que cette protéine modulait l'exposition du site de liaison à CD81 sur E2 (Wahid et al., 2013).

De plus, la sélection d'un virus présentant une diminution de dépendance vis-à-vis du récepteur CLDN1 en faveur du récepteur CLDN6 a conduit à l'identification d'une mutation adaptative dans l'hélice $\alpha 2$ de la glycoprotéine E1 du HCV (H316N) (Hopcraft & Evans 2015). Par ailleurs, certaines mutations de E1 affectant l'infectiosité des HCVpp peuvent conduire à une diminution de la liaison de ces particules à des cellules exprimant CLDN1 (Douam et al., 2014). Dans ce contexte, il a été proposé que l'hétérodimère E1E2 puisse également interagir avec la première boucle extracellulaire (ECL1) de CLDN1.

V.4.c. Fusion : une nouvelle classe de protéine de fusion chez le HCV ?**V.4.c.i. Le processus de fusion**

Dans le but de libérer son génome dans le cytoplasme de la cellule hôte, les virus enveloppés fusionnent leur enveloppe virale avec la membrane cellulaire. La fusion de ces deux bicouches lipidiques, se déroule en plusieurs étapes (revue dans Chernomordik & Kozlov, 2008 ; Harrison, 2008 ; White et al., 2008) (figure 35) qui font intervenir les protéines d'enveloppe du virus. Elle peut avoir lieu à la surface cellulaire à pH neutre ou dans un compartiment endosomal à pH acide.

Tout d'abord, il faut que les deux membranes entrent en contact en surmontant les forces répulsives présentes à leur la surface (figure 35-i). Par la suite, une distorsion locale des deux membranes est nécessaire pour conduire à leur fusion en une seule membrane. Les glycoprotéines de fusion subissent un changement conformationnel de grande amplitude qui est induit par des stimuli spécifiques (pH acide, interaction avec un récepteur). Cette transition structurale favorable d'un état « pré-fusion » vers un état « post-fusion » est couplée à la formation d'états intermédiaires hautement énergétiques. Au cours du changement conformationnel, le peptide de fusion hydrophobe ou la boucle de fusion sont exposés et interagissent avec la membrane cible pour la déstabiliser (figure 35- ii et iii) (Chernomordik & Kozlov, 2008). De cette manière, cette forme intermédiaire de la protéine de fusion relie la membrane virale par son extrémité C-terminale à celle de la cellule hôte par son peptide hydrophobe. Lorsque cette forme intermédiaire retrouve une conformation stable en épingle à cheveux, les deux éléments insérés dans la membrane (le domaine C-ter et le peptide de fusion) se regroupent entraînant la distorsion des deux bicouches lipidiques (figure 35-iv). Ce processus est suivi d'un mélange lipidique des deux membranes (figure 35-v) (hémi-fusion) (Chernomordik & Kozlov, 2003) et la formation d'un pore de fusion (figure 35-vi) (Danieli et al., 1996 ; Roche & Gaudin, 2002).

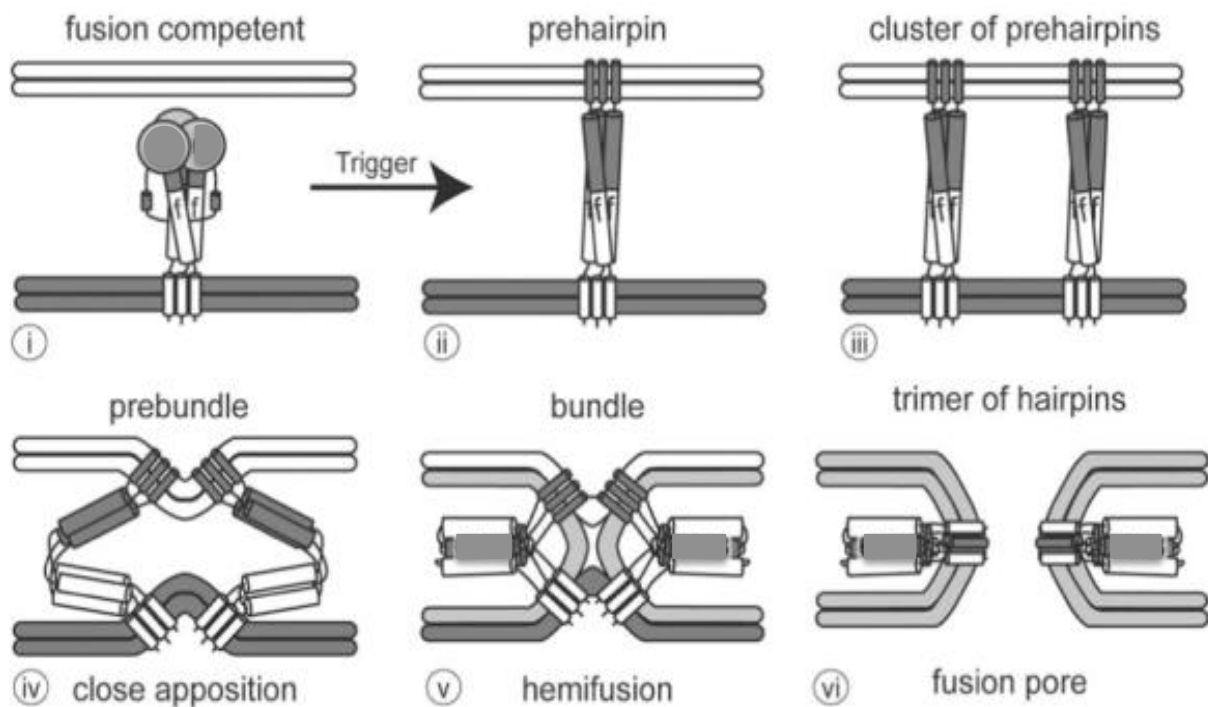


Figure 35. Etape de fusion des deux membranes lipidiques endosomale et virale. Les deux membranes se rapprochent les unes aux autres en déshydratant les interfaces des deux membranes (i). Un changement conformationnel des protéines de fusion induit par le pH faible ou une liaison ligand-récepteur afin de libérer l'énergie stockée à l'intérieur et pour exposer le peptide de fusion. L'insertion de ce peptide dans la membrane endosomale et la formation d'un intermédiaire (ii) et (iii). Rapprochement des deux membranes après repliement des deux régions N et C terminales les unes aux autres (iv). Les deux membranes se réunissent, aboutissant à l'hémifusion (v). Finalement, la protéine de fusion se replie pour avoir la forme de post-fusion où le peptide de fusion et le domaine transmembranaire se réunissent ensemble permettant la formation du pore de fusion (vi) (Adapté à partir de White et al., 2008).

La formation des pores de fusion nécessite l'action coordonnée de plusieurs protéines de fusion dans et en dehors des sites de contacts (Danieli et al., 1996 ; Roche & Gaudin, 2002). Malgré l'existence de différentes formes oligomériques des protéines de fusion dans l'étape de pré-fusion, toutes les structures post-fusion décrites à ce jour présentent une conformation trimérique en épingle à cheveux (*cf figure 36*).

V.4.c.ii. Les inducteurs du processus de fusion

L'activité des protéines de fusion doit être régulée de manière à contrôler le lieu et le moment de la réaction de fusion. Pour cela, la machinerie de fusion est maintenue inactive jusqu'à son induction par un signal spécifique.

Au cours de la formation et la maturation des virions, la protéine de fusion adopte une conformation pré-fusionnelle. Les protéines de fusion des flavivirus sont synthétisées avec une protéine chaperonne qui participe au repliement de la protéine sous sa forme métastable de pré-fusion (Andersson et al., 1997 ; Lorenz et al., 2002). La transition entre les formes de pré-fusion et post-fusion nécessite un inducteur spécifique qui abaisse la barrière d'énergie qui sépare ces deux conformations. Bien que les mécanismes de fusion des bicouches lipidiques soient les mêmes pour tous les virus, l'induction de cette étape est spécifique à chaque virus. Les mécanismes de fusion peuvent être pH dépendant ou pH indépendant. Les mécanismes d'induction font intervenir un pH faible, une liaison au récepteur ou une combinaison des deux. Les virus dont la fusion dépend du pH sont internalisés par endocytose. Dans ce cas, l'enveloppe virale fusionne avec la membrane endosomale. D'autres virus fusionnent à pH neutre directement à surface cellulaire suite à l'interaction avec un récepteur cellulaire.

V.4.c.iii. Les différentes classes des protéines de fusion virales

La caractérisation détaillée des structures 3D d'un certain nombre de protéines de fusion virales a largement contribué à la compréhension des mécanismes moléculaires du processus de fusion. En fonction de leurs caractéristiques structurales et fonctionnelles, les protéines de fusion virales ont été divisées en trois classes (figure 36) (classe I, classe II et classe III) (revues dans Backovic & Jardetzky, 2011 ; Harrison, 2008 ; Kielian & Rey, 2006 ; White et al., 2008).

Bien que la séquence des protéines de fusion virales varie considérablement au sein d'une même classe, les protéines de chaque classe présentent des caractéristiques structurales et des réarrangements communs.

Les protéines de fusion de classe I

Les protéines de fusion de classe I (figure 36) forment des trimères dans leurs conformations pré- et post-fusion. Elles sont synthétisées sous forme de précurseur, qui s'oligomérisent et qui

est ensuite clivé en deux sous-unités qui restent souvent liées par un pont disulfure. Ce clivage est en général médié par une protéase cellulaire (comme la furine) dans la voie de sécrétion de la cellule hôte (revue dans Klenk & Garten, 1994), mais elle peut également faire intervenir des protéases endosomales comme les cathepsines lors de l'entrée dans la cellule cible. Le clivage du précurseur a lieu en amont du peptide de fusion et conduit à l'obtention d'une forme de protéine de fusion métastable.

Les structures de la majorité des protéines de fusion de classe I dans leur conformation pré-fusion se trouvent sous forme de trimère avec une grande région globulaire au niveau de la région N-terminale (à l'interface de la membrane de la cellule hôte) et une longue tige formée par une superhélice (coiled-coil α -helix) (figure 36). Les déclencheurs externes, provoquent un réarrangement conformationnel qui aboutit à l'exposition d'un peptide de fusion précédemment caché et à son insertion dans la membrane cible.

Les protéines de fusion de classe II

Toutes les protéines de fusion virale de classe II connues à ce jour sont trouvées chez des virus appartenant aux familles des *Flaviviridae*, *Togaviridae* et *Bunyaviridae* (revues dans Kielian, 2006 ; Kielian & Rey, 2006 ; Modis, 2014). Les protéines de fusion de classe II sont co-traduites avec une deuxième protéine située au niveau de leur région N-terminale (p62 pour alphavirus, prM pour les flavivirus et Gn pour les bunyavirus), qui fonctionne comme une protéine chaperonne au cours du repliement et du transport de la protéine de fusion. Les protéines de fusion de classe II forment des homo- ou des hétéro-dimères orientés parallèlement à l'enveloppe virale dans leur conformation de pré-fusion, mais après exposition au pH acide dans les endosomes, ils se réarrangent pour former les homotrimères post-fusionnels.

Contrairement aux protéines de fusion de classe I dans lesquelles l'élément de structure secondaire principal est une hélice α , les protéines de fusion de classe II sont essentiellement constituées de feuillets β .

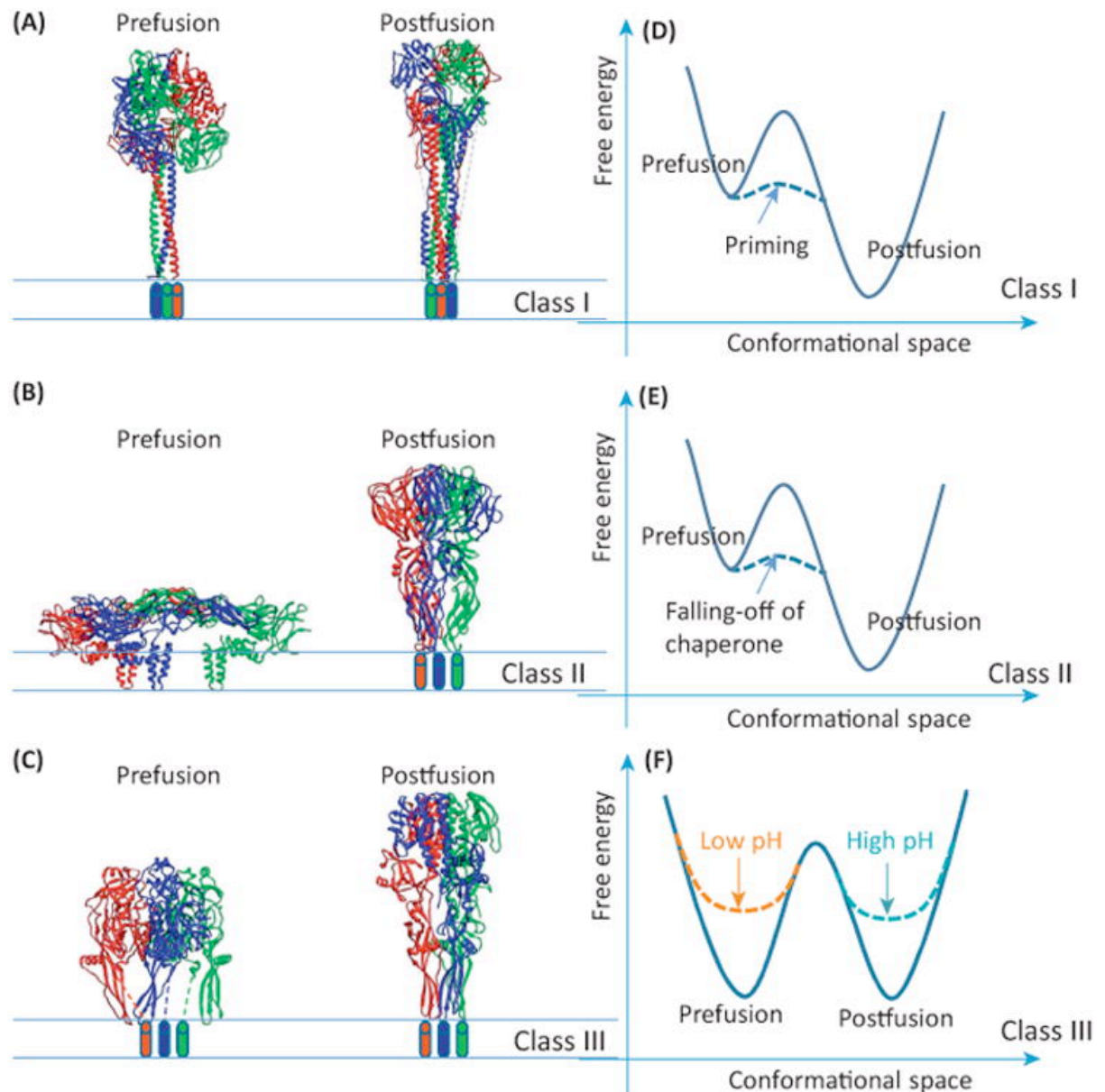


Figure 36. Structure atomique des trois classes de protéines de fusion I, II et III dans leurs formes de pré- et post-fusion. Les modèles atomiques sont représentés sous forme de rubans et les trois monomères de chaque modèle, (A) classe I, (B) classe II et (C) classe III, sont colorés différemment. Les cylindres représentent des hélices transmembranaires. (D-F) l'état énergétique des trois classes de protéines virales de fusion, (D) classe I, (E) classe II et (F) classe III. Les lignes continues représentent l'état initial de la protéine et les lignes pointillées montrent l'état de chaque protéine après les mécanismes déclencheurs de la fusion (Adapté à partir de Ge et al., 2014).

Les protéines de fusion de classe II sont organisées en 3 domaines dans leur conformation pré- et post-fusion (figure 36). Le domaine I N-terminal a une structure de cylindre bêta. Le domaine II, formé par deux segments qui s'étendent depuis le domaine I, est composé principalement de feuillettes β (tableau 3) et comprend une boucle de fusion à son extrémité.

Celle-ci est rendue inaccessible par sa localisation à l'interface des dimères. Le domaine III, situé à l'extrémité opposée du domaine I, présente une structure de type immunoglobuline. Pendant la fusion de la membrane, le repliement global des domaines reste le même, mais leur orientation relative change.

Les protéines de fusion virale de classe III

Les protéines de fusion de classe III sont des molécules à cinq domaines composées à la fois d'hélices α et de feuillets β (revues dans Backovic & Jardetzky, 2011). Les protéines de fusion de classe III identifiées appartiennent à différentes familles de virus (protéine G de rhabdovirus (Roche et al., 2006), herpesvirus gB (Backovic et al., 2009 ; Heldwein et al., 2006) et baculovirus gp64 (Kadlec et al., 2008). Bien que l'organisation tridimensionnelle de ces protéines diffère significativement de celle des classe I et II, certaines caractéristiques communes ont été identifiées (tableau 3). Par exemple, dans leur conformation post-fusion, ces protéines forment un trimère d'hélice α similaire à ceux trouvés chez les protéines de fusion de classe I. Ce domaine se trouve en aval du domaine de fusion qui est riche en feuillets β et ressemble au domaine II des protéines de classe II, avec deux boucles de fusion internes. Une caractéristique particulière de la protéine de fusion de classe III la mieux caractérisée (VSVG pour Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein E) est le caractère réversible du changement conformationnel induit par le pH acide, en l'absence de membrane cible (Baquero et al., 2013 ; Gaudin et al., 1991).

V.4.c.iv. Spécificité de la fusion du HCV

Suite à l'interaction du virus avec les différents facteurs d'entrée cellulaires, le HCV est internalisé dans des puits recouverts de clathrine (Blanchard et al., 2006 ; Meertens et al., 2006). Le trafic intracellulaire du virus s'arrête dans les endosomes précoces dont le pH acide déclenche la fusion entre les membranes virale et endosomale (Koutsoudakis et al., 2006 ; Mertens et al., 2006). Contrairement à d'autres virus dont la fusion est induite à pH acide, les particules sécrétées du HCV sont résistantes aux pH acides dans le milieu extracellulaire. Des données expérimentales suggèrent que l'interaction de la glycoprotéine E2 avec le récepteur CD81 favorise la réactivité des glycoprotéines du HCV au faible pH dans les endosomes (Sharma et al., 2011). D'une façon très intéressante, une étude a révélé que les particules intracellulaires du HCV sont sensibles au pH, ce qui suggère que ces particules acquièrent

leur résistance au pH à une étape tardive avant la sécrétion du virion (Wozniak et al., 2010). Les ponts disulfures intermoléculaires reliant les glycoprotéines d'enveloppe du HCV requièrent peut-être une isomérisation préalable permettant le réarrangement structural des protéines (Krey et al., 2005 ; Vieyres et al., 2010). Une situation similaire a été observée chez les pestivirus.

Tableau 3. Comparaison entre les différentes classes des protéines de fusion. Représentation des propriétés des différentes classes des protéines de fusion.

Property	Class I	Class II	Class III
Major secondary structure	α -helix	β -sheet	α -helix and β -sheet
Requires proteolytic processing for activation	Yes	Yes	No
Oligomeric state of pre-fusion form	Trimer	Homodimer or heterodimer	Trimer
Location of the fusion peptide	Peptide at N-terminus buried in the trimer interface	Internal loop buried at the dimer interface	Internal loop buried at the trimer interface
Fusion trigger	Low pH, receptor(s) binding, low pH + receptor binding	Low pH	Low pH or receptor binding
Post-fusion structure	Trimer of hairpins with a central α -helical coiled-coil	Trimer of hairpins composed of mainly β -sheets	Trimer of hairpins with a central α -helical coiled-coil and domains composed of β -sheets

V.4.c.v. Caractérisation de la structure de E1 et E2 et implication dans le processus de fusion

Au sein de la famille des *Flaviviridae*, tous les virus du genre *Flavivirus* possèdent une protéine de fusion de classe II. Du fait de la conservation de l'organisation du génome chez tous les membres de cette famille, il a été considéré que les virus des autres genres (comme les hépacivirus et les pestivirus) codaient également des protéines de fusion de classe II.

Cependant, la structure, récemment résolue de E2, ne présente pas les caractéristiques structurales des protéines de fusion. En effet, le peptide de fusion candidat initialement proposé (Krey et al., 2010) est situé dans le cœur hydrophobe de la protéine et est peu

susceptible de jouer un rôle direct dans la fusion (Khan et al., 2014 ; Kong et al., 2013). De plus, la protéine E2 ne subit pas de réarrangements structuraux à pH acide. Ainsi, il semble peu probable que E2 soit la protéine de fusion du virus. Cela suggère que E1 seul ou en association avec E2 serait responsable de cette étape. Une région hautement conservée entre les résidus 264 et 290 de E1 est susceptible de contenir une boucle de fusion. Cette région présente en effet certaines caractéristiques des peptides de fusion des flavivirus. Elle est notamment caractérisée par la présence d'un résidu acide hautement conservé (D279), situé à une position similaire à celle trouvée chez de nombreux peptides de fusion des flavivirus. Cette séquence présente également deux résidus Cystéine très conservés (C272 et C281) et deux résidus Glycines qui sont essentiels à la fusion chez les paramyxovirus (Flint et al., 1999). Les peptides correspondants à cette région induisent la fusion de vésicules unilamellaires et interfèrent avec l'infectiosité du HCVcc (Flint et al., 1999 ; Perez-Berna et al., 2009). Ces caractéristiques sont en faveur d'un rôle de cette région dans la fusion. De plus, plusieurs études de caractérisation d'inhibiteurs de l'étape tardive de l'entrée du HCV ont conduit à l'identification de mutants de résistance dans la région C-terminale de ce peptide de fusion potentiel et dans d'autres régions de E1 (Perin et al., 2016 ; Vausselin et al., 2013). Ces données suggèrent que la fusion nécessite l'action coordonnée de plusieurs régions de E1. En accord avec cette hypothèse, deux hélices alpha (α_2 et α_3) présentes dans la région C-terminale de l'ectodomaine de E1 (314-342 a.a) peuvent interagir avec les membranes et sont donc susceptibles de jouer un rôle lors de l'étape de fusion (Spadaccini et al., 2010). De plus, E1 est riche en résidus histidine dont la protonation est responsable du changement de conformation induit par le pH acide (Boo et al., 2012). La résolution de la structure complète de E1 pourrait nous renseigner sur son rôle lors de la fusion du HCV. La structure de la région N-terminale de l'ectodomaine de E1 (1-79 a.a) récemment résolue indique que la protéine ne présente pas une structure de protéine de fusion de classe II (El Omari et al., 2014). De manière similaire au HCV, on pensait que le virus de la diarrhée bovine (BVDV) possédait une protéine de fusion de classe II. Cependant en 2013, la résolution de la structure de E2 du BVDV a révélé un nouveau type de structure différent de celui des protéines de fusion connus. En effet, E2 comporte 4 sandwichs β disposés linéairement de l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale (El Omari et al., 2013 ; Li et al., 2013). Le fait que les protéines de fusion candidates E2 des pestivirus et hépacivirus ne présentent pas les caractéristiques des protéines de fusion suggère que les protéines d'enveloppe E1 constituent les protéines de fusion chez ces virus. De plus, bien que des peptides de fusion potentiels aient

été identifiés dans E1 chez ces deux genres, plusieurs caractéristiques des ces protéines ne sont pas compatibles avec les structures des protéines de classe I, II ou III. Ainsi, les pestivirus et hépacivirus sont susceptibles de définir une nouvelle classe de protéines et un nouveau mécanisme de fusion. Bien que les pestivirus, les hépacivirus et les flavivirus partagent un ancêtre commun dans la famille de *Flaviviridae*, ils auraient pu hériter leur machinerie de fusion de sources différentes.

Contexte et Objectifs

Le virus de l'hépatite C (HCV), découvert en 1989, est un problème majeur de santé publique affectant plus de 170 millions de personnes dans le monde entier, soit l'équivalent de 3% de la population mondiale. Chaque année, l'infection par le HCV conduit au décès de 350 000 personnes. Le HCV a une propension élevée à établir une infection chronique pouvant conduire à long terme à une cirrhose et un carcinome hépatocellulaire. Bien que des progrès récents dans le domaine de la thérapie aient été obtenus, les traitements actuels restent très chers.

Le HCV est un virus à ARN positif simple brin qui code pour une polyprotéine précurseur qui est clivée en 10 protéines virales : core, E1, E2, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B. Les protéines non structurales de NS3 jusqu'à NS5B sont impliquées dans la réplication du génome viral, les protéines p7 et NS2, sont indispensables pour l'assemblage de la particule virale, tandis que les protéines structurales (core, E1, E2) sont les composantes de la particule virale. Les deux glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 se trouvent sous forme d'hétérodimères à la surface de la particule virale et interagissent avec les récepteurs cellulaires. Elles sont les éléments essentiels pour l'entrée et la fusion de l'enveloppe du virus et de la membrane cellulaire de l'hôte. Jusqu'à présent, la recherche sur les glycoprotéines d'enveloppe du HCV a été principalement focalisée sur E2 car elle est la protéine d'attachement aux récepteurs et la principale cible des anticorps neutralisants. Par ailleurs, E2 a été initialement proposée comme la protéine responsable de l'étape de fusion entre les membranes cellulaires et virales. Ainsi, le rôle fonctionnel de E1 reste peu étudié. Cependant, des travaux ont montré que la glycoprotéine E1 participait au repliement de E2 et inversement. De plus, E1 peut affecter la fonction de E2 en modulant sa capacité à interagir avec le corécepteur cellulaire CD81.

La structure cristallographique de la région N terminale de E1 comprise entre les acides aminés 192 et 270 a été récemment publiée et des éléments structuraux ont été caractérisés dans plusieurs régions de cette protéine. Ces données structurales fournissent un point de départ pour des études fonctionnelles de E1 par une approche de mutagenèse dirigée dans le contexte du virus infectieux. De manière à déterminer l'importance de ces régions lors des différentes étapes du cycle infectieux du HCV, nous avons entrepris la mutagenèse des résidus des régions structurées qui sont relativement conservés parmi les différents génotypes du HCV. Les phénotypes des mutants ont été étudiés pour déterminer les effets des mutations sur l'entrée, la réplication et l'assemblage du virus. Les méthodes utilisées et les résultats

obtenus sont décrits dans cette thèse.

❖ Les résultats obtenus lors de la caractérisation des résidus conservés de la région N terminale de E1 dont la structure a récemment été déterminée par radiocristallographie ont fait l'objet d'une publication qui est incluse dans ce manuscrit :

Haddad JG, Rouillé Y, Hanouille X, Descamps V, Hamze M, Dabboussi F, Baumert TF, Duverlie G, Lavie M, Dubuisson J. 2017. *Identification of novel functions for hepatitis C virus envelope glycoprotein E1 in virus entry and assembly*. J Virol 91:e00048-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.00048-17>.

Cet article a été choisi, par les éditeurs du journal « Journal of Virology », comme « spotlight feature » dans l'issue 8, avril 2017.

La résolution récente de la structure de E2 a révélé qu'elle ne présentait pas les caractéristiques des protéines de fusion, suggérant que E1 était responsable de cette étape. En accord avec ces données, une région conservée située au milieu du polypeptide, entre les a.a 270 et 291 présente certaines caractéristiques des peptides de fusion suggérant son implication au cours de ce processus. D'une façon très intéressante, plusieurs études caractérisant des nouveaux inhibiteurs d'une étape tardive de l'entrée du HCV ont montré que certaines mutations de résistance à ces antiviraux peuvent être trouvées dans la partie C-terminale de ce peptide de fusion potentiel renforçant l'hypothèse que ce peptide jouerait un rôle majeur au cours du processus de fusion.

Afin d'investiguer le rôle de cette région de E1, nous avons réalisé la caractérisation fonctionnelle d'une deuxième série de mutants dans les résidus conservés de 278 jusqu'à 311 a.a.

❖ Les résultats de cette partie sont présentés dans la partie II de cette thèse et feront l'objet d'une publication qui est en cours de préparation:

Functional characterization of the Hepatitis C Virus E1 glycoprotein ectodomain. In preparation

Résultats

Partie I

Étude fonctionnelle de la région N-terminale de la glycoprotéine E1 du HCV

Le complexe des glycoprotéines d'enveloppe du HCV est formé par deux sous-unités E1 et E2. Ces glycoprotéines jouent un rôle essentiel dans la morphogenèse virale ainsi que lors de l'entrée cellulaire du HCV. Jusqu'à récemment, les travaux de recherche sur les glycoprotéines d'enveloppe du virus HCV se sont essentiellement focalisés sur E2 car elle est la protéine d'attachement du virus. De plus, elle est la cible majeure des anticorps neutralisants et il a été longtemps postulé qu'elle était la protéine de fusion du virus. Cependant, les récentes publications de la structure de E2 ne mettent pas en évidence la présence d'un peptide de fusion et sa structure ne correspond pas aux critères attendus pour une protéine de fusion, suggérant que la glycoprotéine E1 seule ou en association avec E2 pourrait être responsable de l'étape de fusion. La structure de la région N-terminale de E1 (acides aminés 192 à 270) a récemment été résolue et a mis en évidence la présence d'une épingle à cheveux formée par 2 feuillets beta ($\beta 1$ et $\beta 2$) suivie par un segment de 16 acides aminés qui forme une hélice alpha ($\alpha 1$) flanquant 3 feuillets beta antiparallèles ($\beta 3$, $\beta 4$ et $\beta 5$).

Nous nous sommes basés sur ces travaux récents pour investiguer le rôle fonctionnel de la glycoprotéine E1 par une approche de mutagenèse dirigée des résidus conservés dans la région N-terminale, dans le contexte d'un clone infectieux du HCV. Comme attendu, nos résultats indiquent que ces mutations introduites dans E1 n'ont aucun effet sur la réplication virale. Cependant, treize parmi les dix-neuf mutants produits conduisent à une atténuation ou une perte de l'infectiosité virale. D'une manière très intéressante, deux mutants atténués, le T213A et le I262A, se sont montrés moins dépendants au co-récepteur claudine-1. D'autre part, nous avons montré que ces mutants utilisent un autre récepteur de la famille des claudines (claudine-6) pour l'entrée virale, indiquant ainsi un changement de dépendance à son co-récepteur claudine-1. De façon très surprenante, nous avons également identifié une mutation (D263A) qui conduit à la sécrétion de particules virales dépourvues d'ARN génomique. Une caractérisation plus poussée de ce mutant a de plus révélé une modification dans la co-localisation subcellulaire entre l'ARN viral et la glycoprotéine E1, mettant en évidence pour la première fois un dialogue croisé entre E1 et l'ARN génomique du HCV lors de la morphogenèse du virus. L'article présentant ces résultats se trouve en annexe de cette thèse (annexe P. 157).

Des analyses complémentaires à celles présentées dans l'article (annexe) ont été réalisées. Les résultats obtenus sont présentés ci-dessous.

La glycoprotéine d'enveloppe E1 forme des trimères à la surface de la particule virale ainsi que dans les cellules infectées (Falson et al., 2015). Ainsi, l'effet de la mutation D263A sur la formation de trimères de E1 dans les cellules électroporées a été déterminé. Pour cela, les protéines d'enveloppe E1E2 présentes dans les extraits cellulaires ont été précipitées à l'aide de billes d'agarose couplées à la lectine GNA (pour *Galanthus nivalis*). Le virus mutant Δ E1E2 a été utilisé comme contrôle négatif dans cette expérience. Comme le montre la figure 37, la mutation D263A ne perturbe pas la trimérisation de E1 qui est détectable sous ses trois formes mono, di et trimérique dans le lysat cellulaire après électroporation. De plus, des quantités similaires de E2 sont précipitées pour le mutant D263A et le virus sauvage (WT).

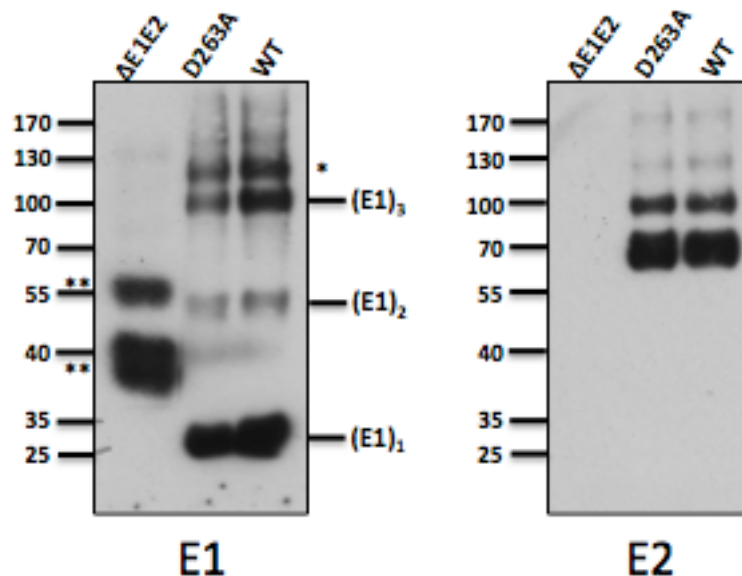


Figure 37. Effet de la mutation D263A sur la trimérisation de E1. Des cellules Huh-7 ont été électroporées avec 10 μ g d'ARN génomique des virus wt et mutants (D263A, Δ E1E2). À 48h post-électroporation, les cellules ont été lysées et les protéines des extraits cellulaires ont été précipitées à l'aide de billes d'agarose couplées à la lectine GNA. Ensuite, un SDS-PAGE a été réalisé afin de détecter les protéines virales E1 et E2. La figure montre les trois formes de E1 (E1)₁, (E1)₂ et (E1)₃ ainsi que la protéine E2 du mutant D263A et du sauvage (WT). L'astérisque représente une bande qui pourrait correspondre à un intermédiaire non clivé de la protéine E1E2p7NS2. Les doubles astérisques désignent des formes chimériques de E1E2 tronquées présentes dans le mutant Δ E1E2. En effet, la délétion introduite dans ce mutant conduit à la synthèse d'une protéine de fusion entre l'extrémité N-terminale de E1 et l'extrémité C-terminale de E2. L'épitope A4 étant présent dans cette protéine de fusion, celle-ci est détectée en western blotting. Il est probable que la forme de plus haute masse moléculaire représente un dimère de cette protéine chimérique.

Effet de la mutation D263A sur l'interaction entre E1 et E2. Afin de confirmer la perte de l'interaction entre les deux glycoprotéines de l'enveloppe observée dans les tests de coprécipitation de la figure 4, une immunoprécipitation (IP) a été réalisée avec l'anticorps anti-E1 (A4) sur des lysats cellulaires obtenus après électroporation des ARN viraux. Dans cette expérience, le mutant S208A est utilisé comme contrôle interne. Le contrôle négatif correspond à une immunoprécipitation réalisée sur du lysat wt sans anticorps primaire. La figure 38 montre que des quantités équivalentes de protéine E1 sont précipitées pour le virus sauvage (WT) et les mutants S208A et D263A. Cependant, par rapport à ce qui est observé pour les contrôles positifs, de plus faibles quantités de E2 coprécipitent avec E1 chez le mutant D263A, confirmant que la mutation D263A conduit à la perte d'interaction entre E1 et E2.

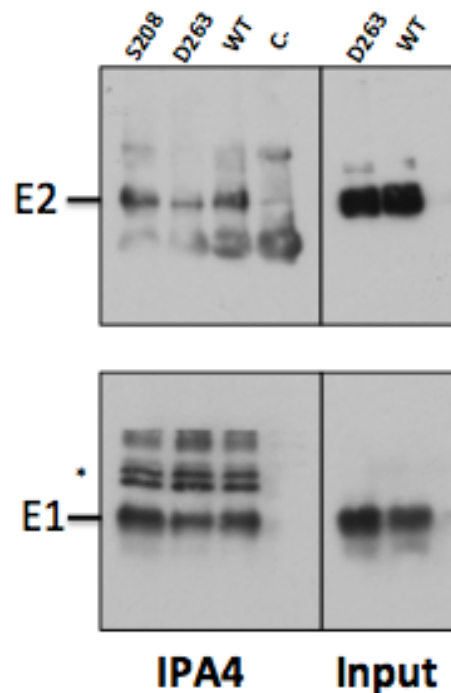


Figure 38. Effet de la mutation D263A sur l'interaction entre E1 et E2. Des cellules Huh-7 ont été électroporées avec les ARN viraux et lysées 48h post-électroporation. Le lysat cellulaire a été utilisé pour réaliser une immunoprécipitation anti-E1 avec l'anticorps A4. Après immunoprécipitation, les protéines E1E2 liées aux billes ont été séparées par SDS-PAGE et détectées avec les anticorps A4 (anti-E1) et 3/11 (anti-E2) en Western blot. L'astérisque représente une bande non spécifique.

Effet des mutations sur la reconnaissance des récepteurs SR-B1 et CD81 par HCV.

Afin de confirmer les résultats obtenus lors des tests de neutralisation à l'aide d'anticorps anti-récepteurs, un test d'inhibition de l'expression de ces récepteurs a été fait en utilisant des siRNA. Nos résultats montrent que l'infectiosité des mutants testés (S208A, T213A, R231A et I262A) est affectée de la même façon que celle du sauvage après inhibition de l'expression du récepteur SR-B1 et CD81.

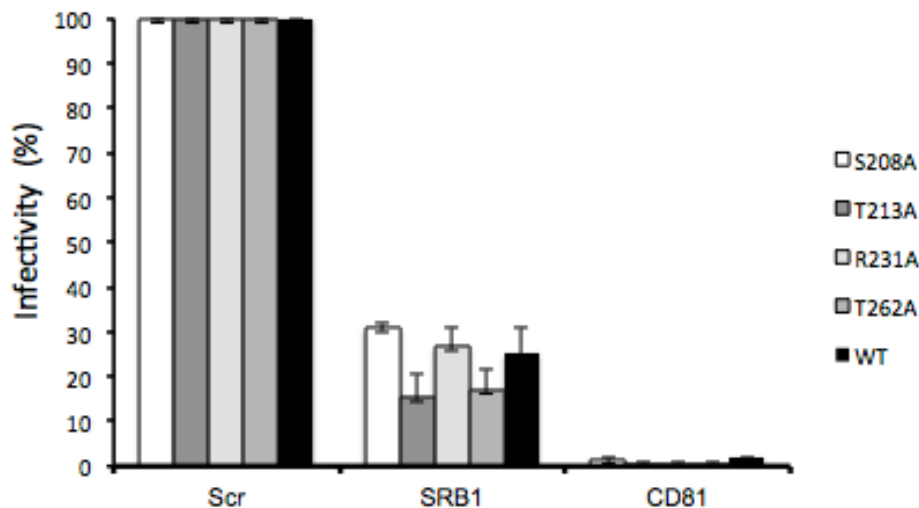


Figure 39. Effet des mutations sur la reconnaissance des récepteurs SR-B1 et CD81. Des cellules Huh-7 ont été transfectées avec les siRNA ciblant SR-B1, CD81 ou le siRNA contrôle. Ces cellules ont été infectées à 72h post-transfection avec les différents virus. À 72h post-infection, les cellules ont été fixées et révélées par immunofluorescence avec un anticorps anti-E1 afin de quantifier les niveaux d'infection. Les valeurs représentées correspondent à la moyenne de trois tests d'inhibition indépendants. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type de trois expériences indépendantes.

Partie II

Etude fonctionnelle des résidus conservés du peptide de fusion potentiel de E1

Partie II : Étude fonctionnelle des résidus conservés du peptide de fusion potentiel de E1

La résolution de la structure de l'ectodomaine de E2 a révélé qu'elle ne présentait pas les caractéristiques structurales des protéines virales de fusion (El Omari et al., 2014). Ces données ont suggéré que E1 pourrait être responsable de l'étape de fusion (*cf partie V.4.c.v. Caractérisation de la structure de E1 et E2 et implication dans le processus de fusion*). Plusieurs résultats sont en faveur de cette hypothèse. Ainsi, une région située au milieu du polypeptide E1 (a.a. 274-291) présente plusieurs caractéristiques des peptides de fusion. Elle contient une séquence conservée hydrophobe, des résidus aromatiques, le motif VFLVG qui est retrouvé dans les peptides de fusion de classe II ainsi que trois cystéines et une proline centrale qui est caractéristique des peptides de fusion interne (Drummer et al., 2007). Par ailleurs les peptides dérivés de cette région interagissent avec les phospholipides membranaires, sont capables de modifier les propriétés biophysiques de membranes modèles et d'induire la fusion de vésicules *in vitro* (Pérez-Berna et al., 2009). Certaines mutations dans les résidus de cette région affectent l'entrée du virus dans les cellules ainsi que la capacité des protéines d'enveloppe E1E2 à induire la fusion dans des tests de fusion cellules-cellules ou HCVpp-liposomes (Drummer et al., 2007 ; Lavillette et al., 2007)

Dans la poursuite de nos travaux sur l'étude fonctionnelle de la glycoprotéine E1, nous avons décidé d'effectuer la même approche de mutagenèse dirigée dans le contexte du clone infectieux du virus JFH1. Nous avons de plus également effectué quelques mutations supplémentaires dans la région située entre ce peptide de fusion potentiel et le segment correspondant à l'hélice alpha-2. Ainsi, nous avons généré une série de mutants dans les résidus conservés parmi les géotypes. Les résidus mutés en alanine sont indiqués dans la Figure 40.

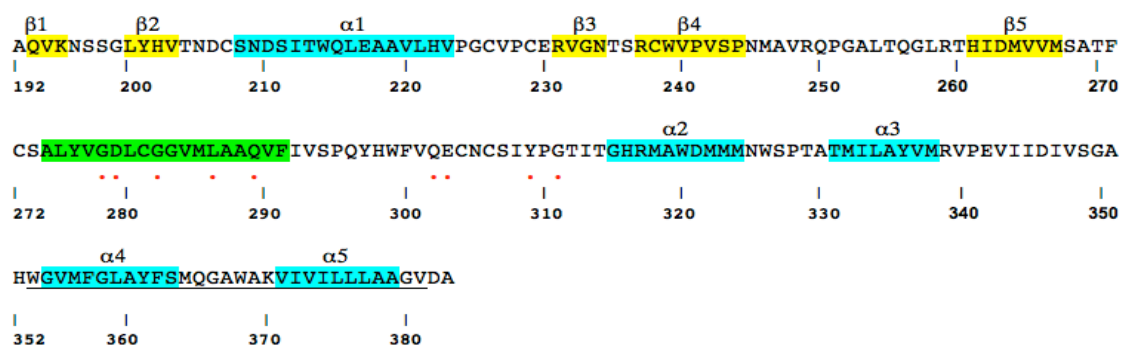


Figure 40. La séquence et les structures secondaires de E1. Dans cette partie nous avons concentré notre étude sur la région 272-311 qui contient le peptide de fusion potentiel. Cette figure montre toutes les structures secondaires identifiées dans E1 (déjà décrites dans la partie protéines structurales). Le peptide de fusion potentiel est surligné en vert et les résidus conservés entre les différents géotypes qui ont été mutés et remplacés par des alanines sont désignés par des points rouges.

Les mutations ont été introduites dans le génome du clone infectieux JFH1 par mutagenèse dirigée (Wakita et al., 2005). En vue de leur caractérisation, les virus HCVcc sauvage (WT) et mutants ont été générés par électroporation de cellules Huh-7 avec les ARN génomiques viraux. Pour cela, les plasmides obtenus ont été linéarisés et transcrits *in vitro* en ARN. Avant électroporation, la qualité de l'ARN synthétisé a été déterminée par électrophorèse en gel d'agarose. Les virus GND et DE1E2 ont été utilisés comme virus contrôles. Le virus GND contient une mutation GND dans le site actif de NS5B et est de ce fait non répliquatif (Delgrange et al., 2007). Le virus DE1E2 contient une délétion dans les séquences codantes de E1 et E2 qui affecte ses capacités d'assemblage (Wakita et al., 2005).

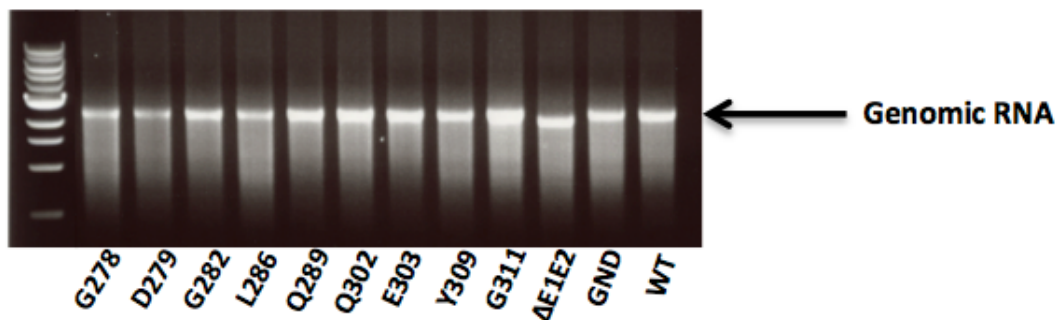


Figure 41. Les ARN génomiques transcrits. Les plasmides obtenus par mutagenèse ont été linéarisés par digestion avec l'enzyme XbaI, traités avec l'enzyme Mung Bean et transcrits *in vitro* en ARN. 0,5 µg de l'ARN génomique de chaque mutant a été chargé sur un gel d'agarose 1% de manière à déterminer la qualité de l'ARN synthétisé.

Effet des mutations sur la réplication virale.

Dans un premier temps, l'absence d'effet des mutations sur la réplication du génome viral a été vérifiée. Pour cela, les niveaux d'expression des protéines virales dans les cellules Huh-7 48h après électroporation ont été déterminés par western blot. Tous les mutants présentent un niveau d'expression de E1, E2 et NS5A similaire à celui observé pour le virus HCV sauvage (WT) (Figure 42) indiquant ainsi que les mutations introduites n'affectent pas la réplication génomique du HCV. Cependant, pour les mutants D279A, Q289A et Q302A une deuxième bande est détectée sous celle correspondant à la protéine E1. Celle-ci pourrait correspondre à une glycoforme de E1 présentant 3 glycanes au lieu de 4 comme cela est parfois observé lors de l'expression de cette protéine sous forme recombinante (Duvet et al., 2002) (figure 42-E1).

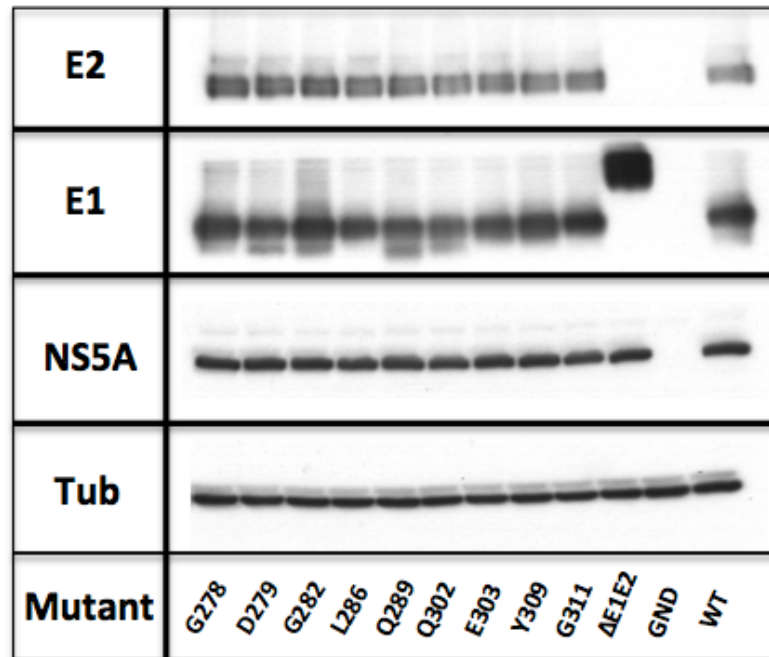


Figure 42. Effet des mutations sur la réplication génomique des mutants. Des cellules Huh-7 ont été électroporées avec 10 µg d'ARN génomique des virus mutants et sauvage (WT), et elles ont été lysées 48h après électroporation. Les protéines virales ont été séparées par SDS-PAGE et détectées par western blotting avec les anticorps monoclonaux A4 (anti-E1), 3/11 (anti-E2) et anti-NS5A. Pour vérifier que la même quantité de lysat cellulaire a été chargée pour chaque mutant, un western blot révélé avec l'anticorps anti β-tubuline a été réalisé en parallèle.

Effet des mutations sur l'infectiosité des mutants

L'effet des mutations sur la production de virus infectieux a été déterminé en testant l'infectiosité intra- et extra-cellulaire après électroporation de cellules Huh-7 avec les ARN viraux. Comme le montre la figure 43, les mutants présentent 3 phénotypes différents pour l'infectiosité : les mutations G278, D279, G282, Q302, Y309 et G311 conduisent à une perte complète d'infectiosité extracellulaire ; les mutants L286 et E303 présentent une diminution d'infectiosité d'un facteur 10 par rapport au virus sauvage ; la mutation Q289 n'a pas d'effet sur l'infectiosité de HCV. De plus, les profils d'infectiosité intracellulaire sont similaires à ceux observés pour les virus extracellulaires, indiquant que les mutations n'affectent pas la sécrétion des particules virales infectieuses. Cette première analyse montre que cette région de E1 contient des résidus cruciaux pour l'infectiosité du virus.

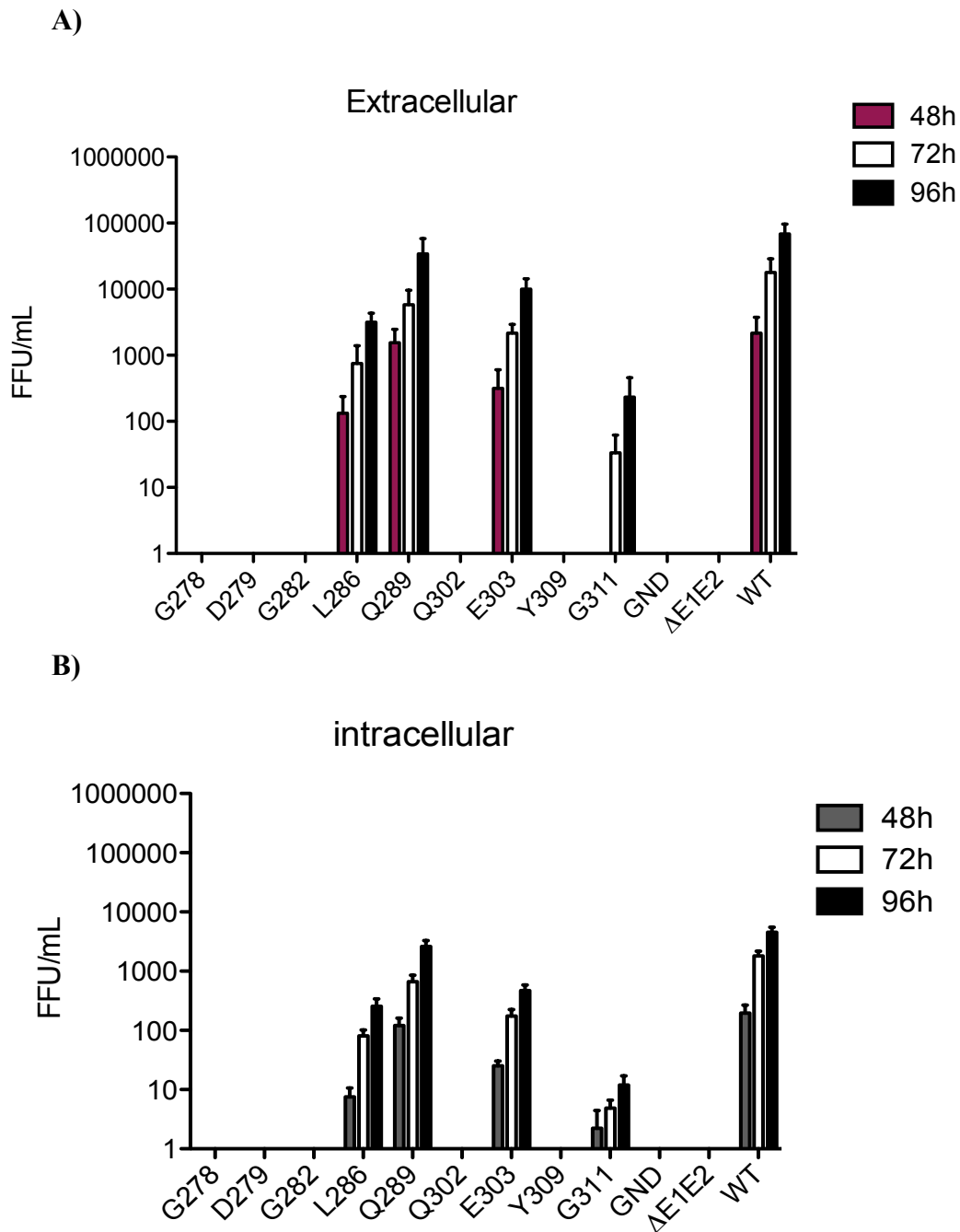


Figure 43. Effet des mutations sur l'infectiosité du HCV. Des cellules Huh-7 ont été électroporées avec les ARN génomiques des virus mutants et sauvage. À 48, 72 et 96h post-électroporation, l'infectiosité des surnageants et des virus intracellulaires a été déterminée par titrage. Les valeurs représentées correspondent à la moyenne de trois expériences indépendantes. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type (SD). Un P value < 0.05 a été déterminé pour les mutants G278A, D279A, G282A, L286A, Q302A, E303A, Y309A et G311A en intra et extracellulaire.

Effet des mutations sur l'assemblage et la sécrétion des particules virales.

De manière à poursuivre la caractérisation des mutants présentant une baisse d'infectiosité, l'effet des mutations sur la sécrétion de particules a été déterminé. Pour cela, l'accumulation de protéine core dans les surnageants et les lysats cellulaires après électroporation a été quantifiée par un test ELISA (Architect HCV Ag Abbott). Les mutants GND et $\Delta E1E2$ ont été utilisés comme contrôles. Les niveaux d'expression intracellulaire de la protéine core de tous les mutants sont similaires à celui du virus sauvage (WT) (figure 44-A) à l'exception du mutant non répliatif GND. Ce résultat confirme l'absence d'effet des mutations sur la réplication du virus. Les profils d'expression extracellulaire de core sont similaires aux profils d'infectiosité extracellulaire (figure 43-A). Ainsi, la majorité des mutations affectant l'infectiosité du virus a un effet sur la sécrétion de la protéine core, ce qui traduit un défaut d'assemblage et/ou de sécrétion de ces virus mutants. Cependant, le mutant non infectieux G311 (figure 43-A), présente un niveau de protéine core extracellulaire comparable à celui obtenu avec le sauvage (figure 44-B). Ces données suggèrent que la mutation G311A conduit à la sécrétion de particules virales non infectieuses.

Effet des mutations sur le repliement et l'hétérodimérisation de E1 et E2

L'effet des mutations sur l'hétérodimérisation de E1 et E2 a été déterminé par des tests d'interaction biochimiques. Dans un premier temps, un test de précipitation a été réalisé avec la grande boucle extracellulaire de CD81 (hCD81-LEL) qui interagit avec la glycoprotéine E2 du virus. La liaison de E2 à CD81 est sensible aux défauts de repliement de E2. La Figure 45-A montre que la protéine E2 de tous les mutants est reconnue par hCD81-LEL d'une manière similaire à la protéine E2 du virus sauvage, cela indique que les mutations introduites dans E1 n'ont pas d'effet sur le repliement de E2. De manière intéressante, la protéine E1 de la majorité des mutants atténués (L286A, E303A) ou non infectieux (G278A, D279A, Q302A, Y309A) est faiblement (L286A et E303A) ou non détectable (G278A, D279A, Q302A et Y309A). Ce résultat suggère que la diminution ou la perte d'infectiosité de ces mutants est due à un défaut d'hétérodimérisation de E1 et E2. L'interaction résiduelle entre E1 et E2 chez les mutants L286A et E303A semble suffisante pour maintenir un certain niveau d'infectiosité (Figure 43). A l'opposé, les mutations G282A et G311A qui sont délétères pour l'infectiosité du virus, n'affectent pas l'interaction entre E1 et E2 qui co-précipitent avec le récepteur CD81. Ainsi, la perte de l'infectiosité de ces deux mutants (G282A et G311A) n'est pas due à un défaut d'hétérodimérisation de E1 et E2 (figure 45-A). Par ailleurs, le mutant G311A ne

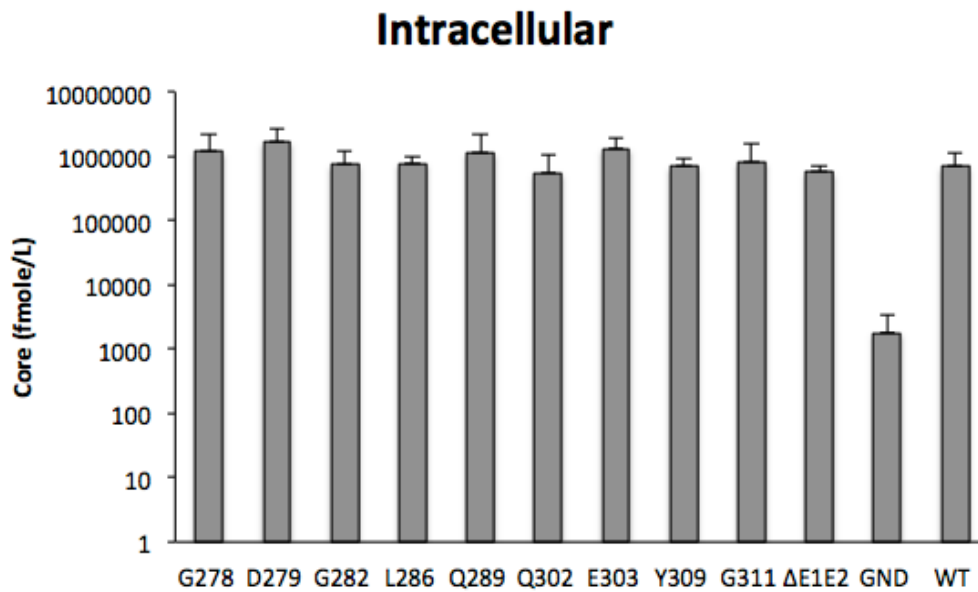
présente pas de défaut d'assemblage ce qui suggère que cette mutation conduit à la sécrétion de particules virales non infectieuses.

Afin d'étudier l'effet des mutations sur la conformation de E1 et E2, des tests d'immuno-précipitation ont été réalisés à l'aide d'anticorps monoclonaux sensibles à la conformation de ces protéines. Dans un premier test, l'anticorps conformationnel AR5A a été utilisé. Cet anticorps reconnaît un épitope conformationnel chevauchant E1 et E2 (Giang et al., 2012). Les glycoprotéines E1 et E2 des mutants G278A, D279A, Q302A, E303A et Y309A sont faiblement ou non reconnues par l'anticorps AR5A (figure 45-B). Cela confirme les résultats obtenus lors de la précipitation avec CD81, indiquant une perte d'interaction entre E1 et E2 chez ces mutants. De plus, ce résultat suggère que ces mutations affectent aussi la conformation de E1 et E2. Ainsi l'altération de la conformation de l'hétérodimère E1E2 contribue probablement à la perte ou à la diminution de l'infectiosité des mutants G278A, D279A, Q302A, E303A et Y309A. Comme observé lors de la précipitation avec CD81, les mutations G282A et G311A n'affectent pas la conformation de E1E2. De manière inattendue, la mutation L286A qui affecte l'hétérodimérisation de E1 et E2 n'a pas d'effet sur la reconnaissance de l'épitope chevauchant ces deux protéines par AR5A. Ce résultat pourrait être dû à une altération partielle de l'affinité entre E1 et E2 chez ce mutant.

Un deuxième test d'immuno-précipitation a été effectué avec l'anticorps conformationnel IGH-526, qui reconnaît une région située entre les acides aminés 314 et 324 de la glycoprotéine E1 (Kong et al., 2015). La glycoprotéine E1 de tous les mutants à l'exception du mutant Q302A est reconnue par l'anticorps IGH-526 (figure 45-C), indiquant que ces mutations n'affectent pas de manière drastique la conformation de E1. Cependant, de plus faibles quantités de E2 co-précipitent avec la protéine E1 des mutants G278A, D279A, Q302A, E303A et Y309A qu'avec la protéine E1 sauvage, confirmant un défaut d'hétérodimérisation des protéines d'enveloppe pour ces mutants (figure 45-C). De plus, ce test d'immunoprécipitation, confirme l'existence d'une interaction résiduelle entre E1 et E2 chez le mutant L286A, qui est probablement responsable de l'infectiosité atténuée de ce mutant.

Aucun des tests biochimiques utilisés n'a pu mettre en évidence de défaut de conformation ou d'hétérodimérisation pour le mutant G311A dont la perte d'infectiosité reste inexplicée.

A)



B)

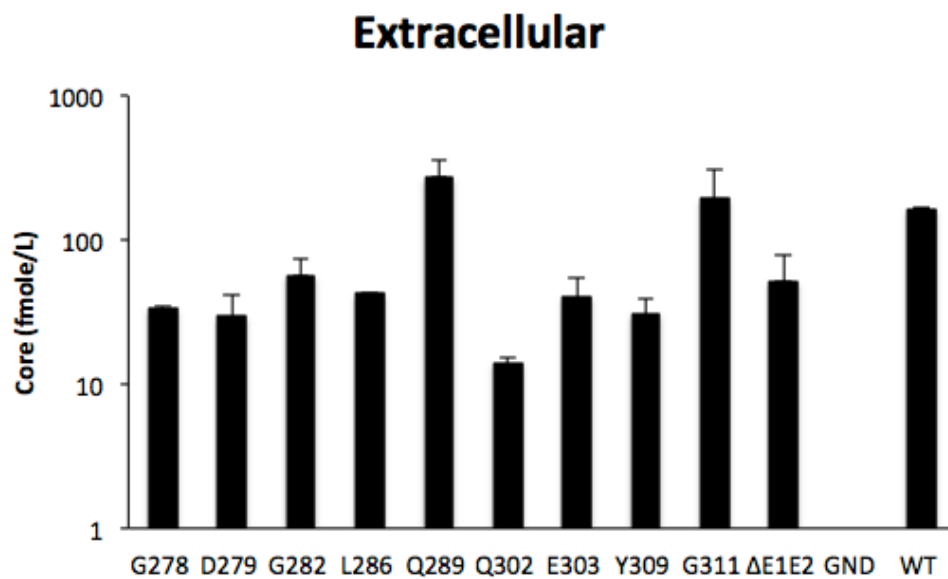


Figure 44. Détermination de la sécrétion de la protéine core. Des cellules Huh-7 électroporées avec les ARN génomiques des virus mutants et sauvage (WT) ont été lysées à 48h post-électroporation et la quantification de la protéine core intracellulaire a été réalisée dans le lysat cellulaire (A). Les concentrations de la protéine core dans les surnageants ont été déterminées en parallèle (B). La quantification a été faite avec le kit ELISA de la société Abbott. Les valeurs représentées correspondent à la moyenne de trois quantifications indépendantes. Les barres d'erreurs représentent les écart-types. P value <0,05 pour les mutants G278A, D279A, G282A, L286A, Q302A, E303A et Y309A en extracellulaire.

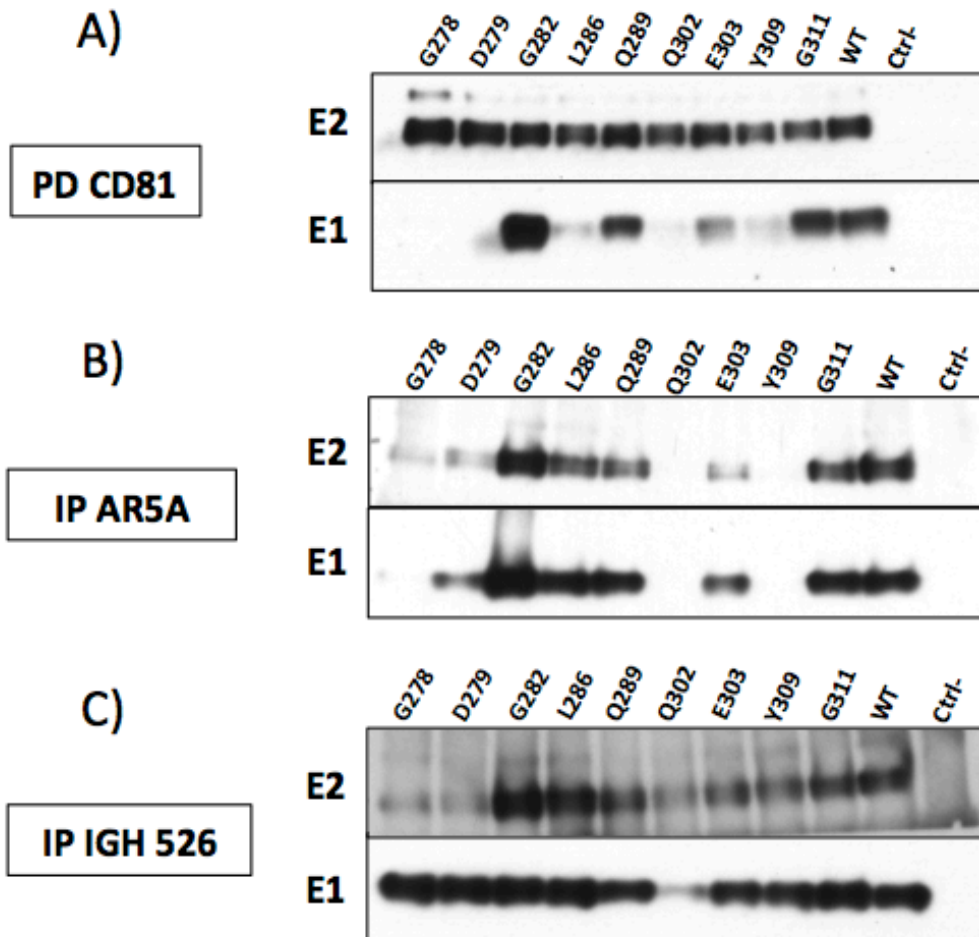


Figure 45. Effet de la mutation sur le repliement et l'hétérodimérisation de E1E2. (A) précipitation à l'aide de CD81 attachée à des billes d'agarose montrant l'interaction de E1E2 avec le récepteur CD81. Les cellules électroporées ont été lysées à 48h post-électroporation. Le lysat cellulaire a été utilisé pour réaliser les précipitations mettant en jeu l'interaction de la protéine de fusion CD81-LEL-GST avec les billes de glutathione agarose. Après précipitation, les protéines E1E2 liées aux billes ont été séparées par SDS-PAGE et détectées avec les anticorps A4 (anti-E1) et 3/11 (anti-E2) en western blotting. (B et C) Tests d'immuno-précipitations (IP) pour étudier les interactions de E1E2 avec les anticorps conformationnels AR5A (B) et IGH 526 (C). 48h après électroporation avec les génomes viraux sauvages ou mutants les cellules ont été lysées pour effectuer les immunoprécipitations. Les protéines immunoprécipitées ont été séparées par SDS-PAGE et détectées par western blot en utilisant les anticorps A4 et 3/11.

Effet des mutations sur la sensibilité de HCV à l'inhibition par les anticorps neutralisants et par hCD81-LEL

La structure quaternaire des glycoprotéines d'enveloppe subit des changements conformationnels au cours de leur incorporation à la surface de la particule virale. Les analyses biochimiques des glycoprotéines associées au virus sont difficiles à mettre en œuvre car elles requièrent d'importantes quantités de particules. Une approche alternative plus sensible consiste à déterminer la sensibilité des virus mutants à l'inhibition médiée par les anticorps neutralisants ou CD81-LEL. Cependant, cette approche est uniquement envisageable pour la caractérisation des glycoprotéines associées aux virus mutants atténués. Ainsi, les tests d'inhibition d'infectiosité n'ont pu être réalisés qu'avec les mutants L286A et E303A, qui présentent une diminution d'infectiosité d'un facteur 10 par rapport au virus sauvage. Au cours de ces expériences, le mutant Q289A qui présente un phénotype sauvage a été utilisé comme contrôle interne.

Les tests d'inhibition de l'infectiosité des virus par hCD81-LEL et de neutralisation par AR5A ne révèlent aucune différence de sensibilité entre les virus mutants et le virus sauvage (figure 46-A et B). Ainsi, bien que les tests d'interactions biochimiques réalisés sur les formes intracellulaires des glycoprotéines d'enveloppe aient mis en évidence un effet des mutations L286A et E303A sur la formation de l'hétérodimère, ces mutations ne semblent pas affecter la conformation de l'hétérodimère à la surface de la particule virale.

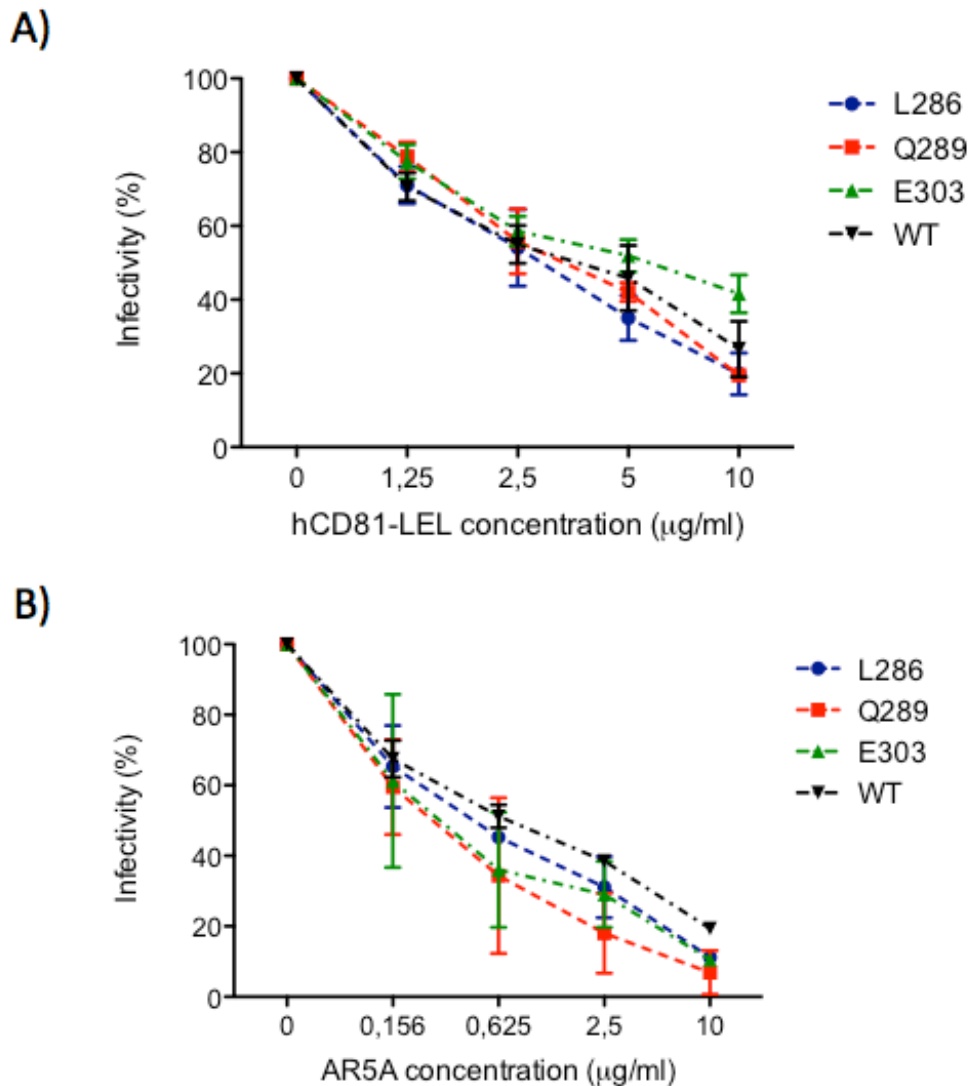


Figure 46. Les tests de Neutralisation et d'inhibition de l'infectiosité par AR5A et hCD81-LEL. (A) Le test d'inhibition de l'infectiosité (hCD81-LEL) et (B) la neutralisation par AR5A, Ces tests ont été réalisés par incubation des virus mutants ainsi que le virus sauvage avec différentes concentrations de hCD81-LEL et l'Ac AR5A pendant 2h à 37°C. Le mélange a ensuite été inoculé sur des cellules Huh-7. À 6h post-infection, le mélange a été aspiré et remplacé par du milieu de culture DMEM. Après 72h d'incubation, les cellules ont été fixées avec du méthanol et une immunofluorescence IF a été effectuée pour déterminer toute infectiosité résiduelle. Les valeurs montrées représentent la moyenne de trois tests d'inhibitions indépendantes. Les barres d'erreurs représentent les écart-types (SD).

Effet des mutations sur la dépendance de HCV aux principaux récepteurs cellulaires

Pour déterminer l'effet des mutations sur la dépendance aux principaux récepteurs cellulaires du HCV, des tests de neutralisation et d'inhibition de l'expression des récepteurs ont été réalisés. Les tests d'inhibition de l'infectiosité à l'aide d'anticorps anti-CD81 (JS81) ou anti-SR-BI (Cla-I) n'ont révélé aucune différence de sensibilité entre les mutants L286A, E303A et le virus sauvage (figure 47-A et B). Afin de confirmer ce résultat, l'effet de l'inhibition de l'expression de ces récepteurs par ARN interférence a été évalué (siSR-B1 et siCD81) (figure 47-C). L'inhibition de l'expression de CD81 conduit à une diminution drastique de l'infection pour les virus sauvage et mutants. L'inhibition de l'expression de SR-BI se traduit par une inhibition d'environ 70% de l'infectiosité pour les virus sauvage et mutants. Cette approche a permis de confirmer l'absence d'effet des mutations L286A et E303A sur la dépendance du HCV aux récepteurs CD81 et SR-BI.

Cependant, lors de la neutralisation du récepteur CLDN1 par l'anticorps monoclonal anti-CLDN1 (OM8A9-A3), les deux mutants L286A et E303A présentent des profils différents de ceux observés avec les virus contrôle interne (Q289A) et sauvage (figure 47-D). Ainsi, une concentration de 0,1 µg/mL d'anticorps conduit à l'inhibition de 50% de l'infectiosité de ces mutants alors qu'elle n'inhibe que 20% de l'infectiosité des virus sauvage et Q289A. Les mutants L286A et E303A présentent donc une plus grande sensibilité à l'inhibition par l'anticorps anti-CLDN1 que le virus sauvage. Ces données indiquent que les mutants L286A et E303A présentent une plus grande dépendance vis-à-vis du récepteur CLDN1 pour l'entrée dans les cellules Huh-7.

Cependant, le test de neutralisation du récepteur CLDN6 n'a pas révélé de différence de sensibilité entre les mutants L286A, E303A et le virus WT (figure 47-E). De manière similaire au virus sauvage, ces mutants restent peu dépendants de ce récepteur pour l'entrée dans les cellules.

Du fait de l'indisponibilité d'anticorps anti-OCLDN neutralisant l'infection, la dépendance des mutants à ce récepteur a été testée dans une lignée Huh-7 n'exprimant pas l'OCLDN (OKH4) (Shirasago et al., 2016). Tous les mutants testés se sont révélés incapables d'infecter les cellules OCLDN KO montrant ainsi l'importance de ce récepteur pour l'entrée virale.

Ainsi, les résultats obtenus montrent que les mutations L286A et E303A n'ont pas d'influence sur la dépendance du HCV aux récepteurs CD81, SR-B1, CLDN6 et OCLDN. Par contre, ces mutations accentuent la dépendance du HCV à CLDN1 pour l'entrée dans les cellules Huh-7.

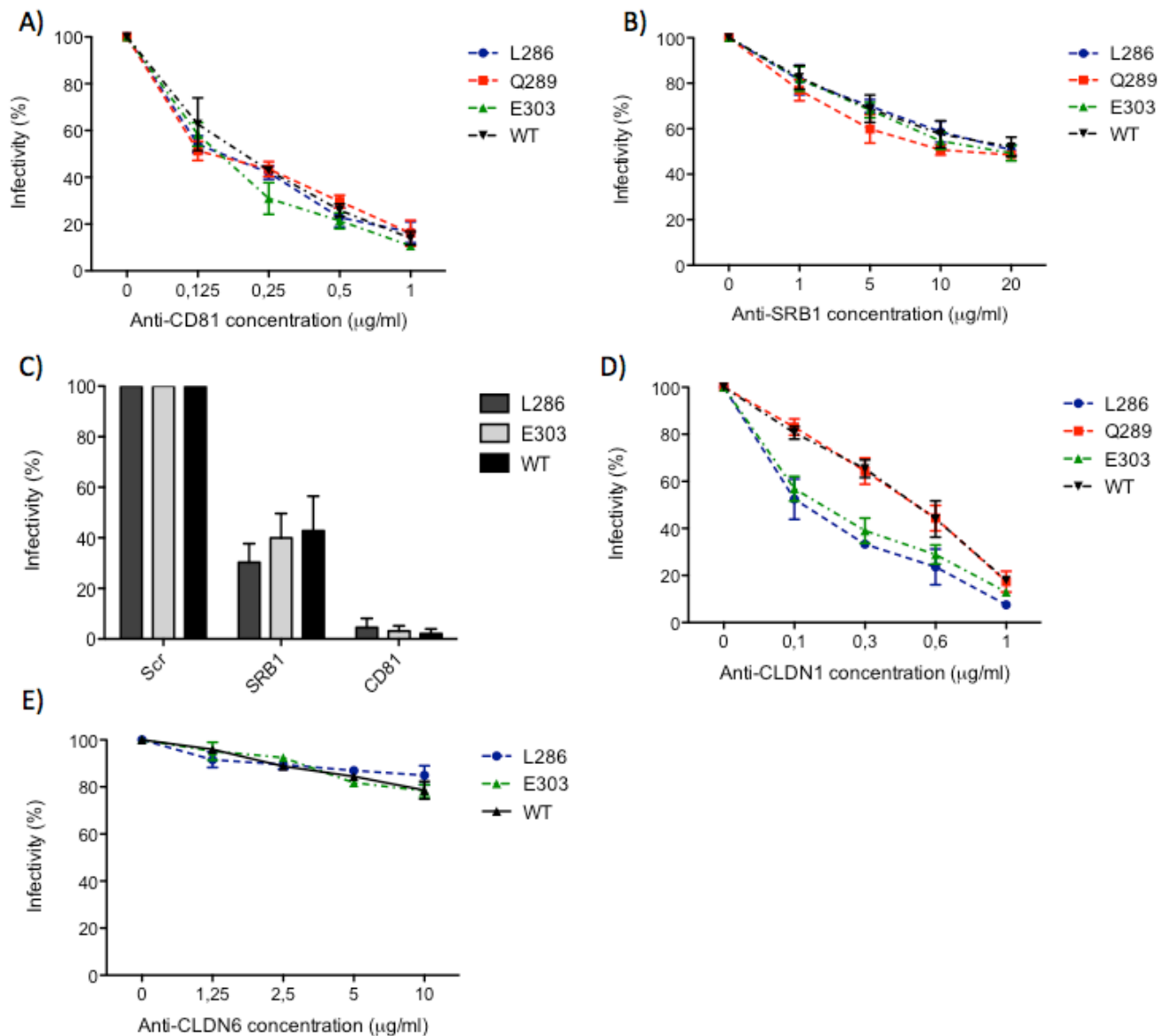


Figure 47. Tests de neutralisation et d'inhibition des récepteurs. Des cellules Huh-7 ont été pré-incubées avec des concentrations croissantes d'anticorps anti-récepteurs : (A) anti-CD81 JS81, (B) anti SR-B1 Cla-I, (D) anti-CLDN1 OM8A9-A3 et (E) anti-CLDN6 MAb 342927. Les cellules ont été infectées par les mutants ou le virus sauvage. À 6h post-infection, le milieu a été remplacé par du milieu de culture. Après 72h d'incubation, les cellules ont été fixées au méthanol. Une immunofluorescence a été réalisée avec l'anticorps anti-E1 (A4) afin de quantifier l'infectiosité. Les valeurs présentées dans la figure sont les résultats de trois tests de neutralisation indépendants. Les barres d'erreurs représentent les écart-types (SD). (C) Des cellules Huh-7 ont été transfectées avec des siRNA ciblant SR-B1 ou CD81 ou le siRNA contrôle (siSCR). À 48h post-transfection, les cellules ont été infectées avec les virus mutants ou sauvage. Après 72h d'incubation, les cellules ont été fixées au méthanol. Une immunofluorescence a été effectuée avec l'anticorps anti-E1 (A4) afin de quantifier les cellules infectées. Les données représentent la moyenne de trois expériences indépendantes. Les barres d'erreurs représentent les écart-types (SD).

Caractérisation du mutant G311

Le mutant G311A est non infectieux, mais cette mutation n'a pas d'effet sur l'interaction entre E1 et E2, ni sur le repliement de ces protéines (figures 45, 46 et 47). De plus, pour ce mutant le niveau de sécrétion de la protéine core est comparable à celui obtenu avec le virus sauvage. Ce résultat suggère que cette mutation conduit à la sécrétion de particules non infectieuses. De manière à mieux caractériser les formes sécrétées de ce mutant, nous avons cherché à déterminer si ces particules contenaient de l'ARN viral. Pour cela les particules présentes dans le surnageant après électroporation des cellules Huh-7 ont été concentrées par une étape de précipitation au polyéthylène glycol (PEG). Cette étape permet d'éliminer l'ARN libre présent dans le milieu après électroporation. Après cette étape, l'ARN viral a été extrait et quantifié par RTqPCR. En parallèle, l'ARN viral intracellulaire a été quantifié. Le mutant non répliatif GND et le mutant $\Delta E1E2$ qui présente un défaut d'assemblage ont été utilisés comme contrôles négatifs. Suite à l'électroporation de cellules Huh-7, un niveau équivalent d'ARN viral intracellulaire a été obtenu pour le mutant G311 de E1 ainsi que le contrôle $\Delta E1E2$ et le virus sauvage. Ces données sont en accord avec l'absence d'effet des mutations sur la répliation du virus (figure 48-A). Le mutant non répliatif GND présente un niveau d'ARN viral intracellulaire inférieur à celui obtenu pour le virus sauvage et les mutants répliatifs. Le mutant G311A présente un niveau d'ARN extracellulaire comparable à celui obtenu avec le virus sauvage (figure 48-B), indiquant ainsi que cette mutation n'affecte pas le recrutement de l'ARN génomique viral lors de la phase d'encapsidation. Finalement, la caractérisation du mutant non infectieux G311A n'a pas mis en évidence de défaut de structure des glycoprotéines ni d'assemblage permettant d'expliquer la perte d'infectiosité de ce mutant. Dans ce contexte, l'hypothèse la plus plausible est que cette mutation affecte l'entrée du virus dans les cellules.

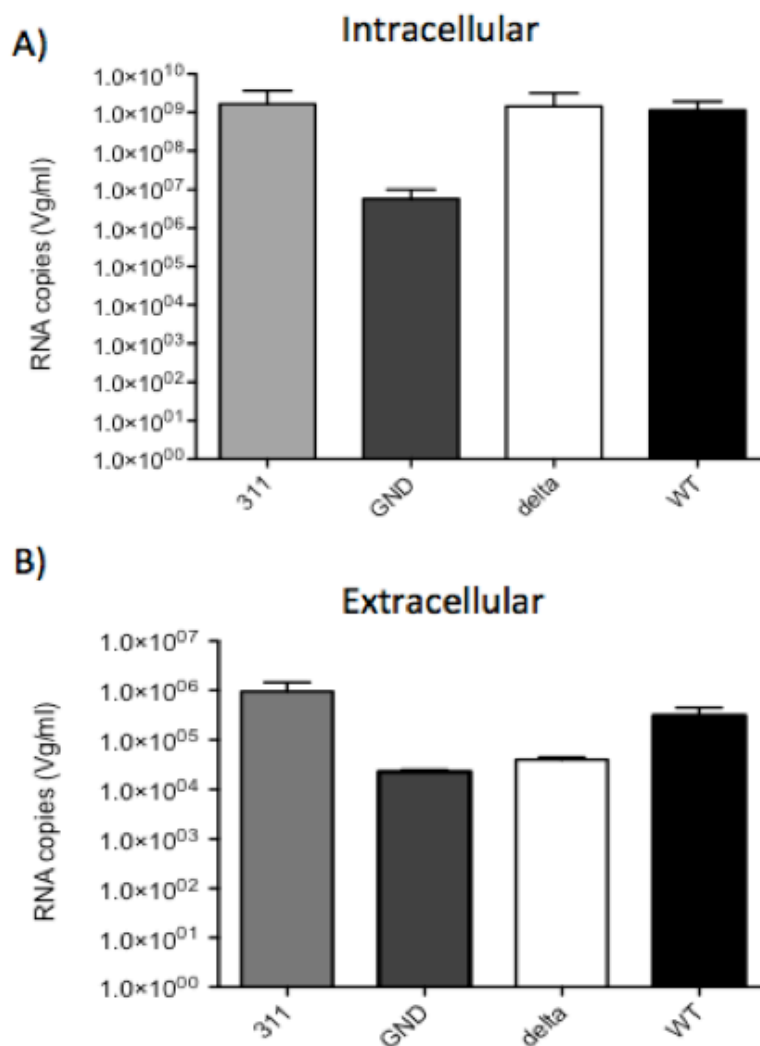


Figure 48. Quantification intra et extracellulaire de l'ARN viral après précipitation avec PEG.

Les cellules Huh7 ont été électroporées avec l'ARN viral sauvage et mutants. A 48h post-électroporation, les ARN intracellulaires ont été extraits. En parallèle, les surnageants ont été collectés et les virus extracellulaires précipités par addition de PEG (6000) à une concentration finale de 8%. Le mélange a été incubé sur glace pendant 1h avec agitation et une nuit à 4°C. La solution a été centrifugée à 8000 trs/min pendant 25 min, le culot a été resuspendu avec 10 ml de surnageant et re-centrifugé à 8000 trs/min pendant 20 min. Enfin, le surnageant a été éliminé et le culot a été resuspendu dans 11 mL de PBS1X froid. Après 30 minutes d'incubation à 4°C, la suspension virale a été centrifugée pendant 5 min à 2000 trs/min de manière à éliminer le matériel insoluble. Les virus ont ensuite été culottés par ultracentrifugation à 27000 trs/min à 4°C (rotor SW41). Le culot obtenu a été resuspendu dans de DMEM complet. L'ARN viral a été isolé à partir de cette suspension. Enfin, la quantification de l'ARN viral intra et extracellulaire a été faite par RTqPCR.

Effet de la mutation G311A sur la trimérisation de E1

Les glycoprotéines d'enveloppe E1 s'associent sous forme de trimères non covalents à la surface de la particule virale ainsi que dans les cellules infectées (Falson et al., 2015). De plus, la trimérisation de E1 est essentielle à l'infectiosité des particules. Dans ce contexte, nous avons déterminé l'effet de la mutation G311A sur la formation de trimères de E1 dans les cellules Huh7 après électroporation de l'ARN viral. Pour cela, les protéines d'enveloppe E1E2 présentes dans les lysats cellulaires ont été concentrées par précipitation avec des billes d'agarose couplées à la lectine GNA (pour *Galanthus nivalis*). Les protéines d'enveloppe précipitées ont été analysées par SDS-PAGE et Western blot dans des conditions réductrices sans dénaturation thermique. Comme contrôle négatif, nous avons utilisé le virus mutant Δ E1E2. Comme le montre la figure 49, la mutation G311A n'a pas d'effet sur la trimérisation de E1 qui est détectable sous ses trois formes mono, di et trimérique dans le lysat cellulaire après électroporation. Ainsi, la perte d'infectiosité du mutant G311A ne peut être attribuée à l'incapacité de E1 à former des trimères.

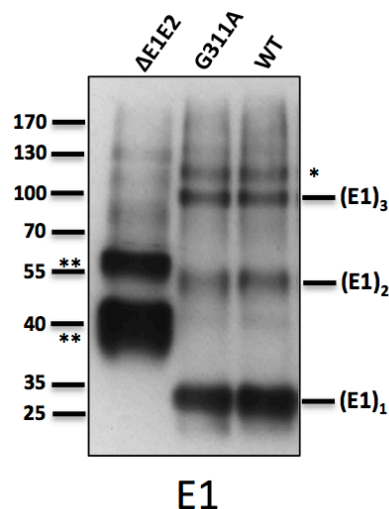


Figure 49. Effet de la mutation G311A sur la trimérisation de E1. Les cellules Huh-7 ont été électroporées avec 10 μ g d'ARN génomique des virus wt et mutants (G311A, Δ E1E2). À 48h post-électroporation, les cellules ont été lysées et les protéines des extraits cellulaires ont été précipitées à l'aide de billes d'agarose couplées à la lectine GNA. Ensuite, un SDS-PAGE a été réalisé afin de détecter la protéine virale E1. La figure montre les trois formes de E1 ($(E1)_1$, $(E1)_2$ et $(E1)_3$) du mutant G311A et du sauvage (WT). L'astérisque représente une bande qui pourrait correspondre à un intermédiaire non clivé de la protéine E1E2p7NS2. Les doubles astérisques désignent des formes chimériques de E1E2 tronquées présentes dans le mutant Δ E1E2. En effet, la délétion introduite dans ce mutant conduit à la synthèse d'une protéine de fusion entre l'extrémité N-terminale de E1 et l'extrémité C-terminale de E2. L'épitope A4 étant présent dans cette protéine de fusion, celle-ci est détectée en western blotting. Il est probable que la forme de plus haute masse moléculaire représente un dimère de cette protéine chimérique.

Discussion et conclusion

Les protéines d'enveloppe E1 et E2 forment un hétérodimère non covalent qui représente l'unité de base impliquée dans les fonctions d'assemblage et d'entrée du virus HCV. Les études structurales de ces protéines se sont révélées difficiles du fait de leur hétérogénéité lorsqu'elles sont exprimées sous forme de protéines recombinantes car elles sont hautement glycosylées et elles ont une forte tendance au mauvais repliement. Pendant longtemps, les études structure-fonction de ce complexe se sont focalisées sur la glycoprotéine E2. En effet, il a été rapidement montré que cette protéine était responsable de la liaison de la particule virale aux récepteurs. Elle est également la cible principale des anticorps neutralisants et sur base d'analogies avec d'autres membres de la famille des *Flaviviridae*, il a rapidement été proposé que E2 était la sous-unité responsable du processus de fusion au cours de l'étape d'entrée virale et un modèle structural basé sur les protéines de fusion de classe II a été proposé (Krey et al., 2010). Ce modèle a cependant été remis en question après publication de la première structure cristallographique de la majeure partie de l'ectodomaine de E2 (Khan et al., 2014 ; Kong et al., 2013). En effet, la structure de cette sous-unité n'a montré aucune ressemblance avec les protéines de fusion de classe II, ni d'ailleurs avec aucune autre classe de protéine de fusion. De plus, cette structure ne montre pas la présence d'un peptide de fusion potentiel, suggérant que la sous-unité E2 ne serait pas une protéine de fusion.

Ces nouveaux résultats ont conduit plusieurs chercheurs à proposer que la glycoprotéine E1 est la protéine de fusion au sein de l'hétérodimère E1E2 (Li & Modis, 2014). Depuis, un regain d'intérêt s'est manifesté pour cette protéine ayant été peu étudiée du fait qu'elle était considérée comme jouant un rôle accessoire. Une première structure de la région N-terminale de cette protéine a rapidement été publiée (El Omari et al., 2014), donnant une première base structurale pour des études structure-fonction. En prenant avantage de ces données récentes, nous avons réalisé une étude fonctionnelle de la région N-terminale de la glycoprotéine E1 du HCV (partie I de cette thèse) en nous basant sur la structure de cette région. Dans une seconde partie expérimentale (Partie II), nous avons également entrepris une étude de mutagenèse dirigée sur une autre région de E1 qui a été proposée comme contenant le peptide de fusion potentiel (Drummer et al., 2007 ; Lavillette et al., 2007 ; Pérez-Berna et al., 2009). La figure 40 reprend la séquence de la protéine E1 de la souche JFH1 et indique les acides aminés qui ont été mutés au cours de cette thèse.

Au cours de la première partie de cette thèse, nous avons généré une série de mutants des régions structurées de la partie N-terminale de E1 ($\beta 1$, $\alpha 1$, $\beta 3$, $\beta 4$ et $\beta 5$), en remplaçant l'acide aminé ciblé par une alanine dans le contexte d'un clone infectieux du virus HCV permettant ainsi d'étudier l'effet de ces mutations dans le contexte du cycle infectieux viral. Comme

attendu, aucune de nos mutations n'affectait la réplication génomique. La caractérisation des mutants a montré que les régions $\alpha 1$, $\beta 4$ et $\beta 5$ contiennent des résidus essentiels pour le cycle infectieux du HCV, puisque dans ces régions certaines mutations (W214A, Q215A, H222A, W239A, D263A) ont conduit à la perte complète d'infectiosité. Cette perte d'infectiosité était due à une altération dans le repliement de E2 ou la perte d'interaction entre E1 et E2, causée par la mutation dans E1. Il a en effet été montré que ces deux protéines interagissent au cours de leur repliement pour former un hétérodimère non covalent (Brazzoli et al., 2005 ; Cocquerel et al., 2003 ; Michalak et al., 1997 ; Patel et al., 2001). La perte d'interaction entre E1 et E2 des mutants H222A, W239A, I262A et D263A est en accord avec le modèle structural récent de Freedman et al dans lequel la région de E1 comportant les deux feuillettes Beta ($\beta 1$ et $\beta 2$) et l'hélice alpha ($\alpha 1$) (résidus 192 à 215) ainsi que celle des résidus 258 à 268 a.a. sont impliquées dans l'hétérodimérisation de E1 et E2 (Freedman et al., 2017). Du fait de la perte d'infectiosité des mutants W214A, Q215A, H222A et W239A, une caractérisation plus approfondie était impossible en utilisant les approches fonctionnelles développées dans notre étude. D'autres mutants ont présenté une réduction légère ou drastique de l'infectiosité. Ces résultats soulignent l'importance de ces régions dans l'infectiosité du HCV et dans la biogenèse de E1 et E2.

Ensuite, nous avons continué la caractérisation des mutants atténués dans leur infectiosité. Les différentes analyses effectuées au cours de ce travail (pulldown, immunoprécipitation, neutralisation, inhibition, quantification de la protéine core...) ont permis de définir des phénotypes intéressants. En effet, nous avons obtenu deux mutants (T213A et I262A) qui présentaient une diminution de la dépendance au récepteur CLDN1 pour l'entrée. De plus, nous avons également montré que cette diminution de dépendance vis-à-vis de CLDN1 était compensée par l'utilisation de CLDN6, une autre protéine de jonction serrée capable de remplacer la fonction de CLDN1 dans l'entrée cellulaire du HCV (Meertens et al., 2008 ; Zheng et al., 2007). Ces deux acides aminés se situent dans deux régions différentes de la glycoprotéine E1. Il s'agit de l'hélice $\alpha 1$ (T213) et du brin $\beta 5$ (I262). De plus, un phénotype similaire avait déjà été rapporté pour une mutation du résidu H316 situé dans l'hélice $\alpha 2$ (figure 40) de E1 (Hopcraft et al., 2015). Ces résultats suggèrent que les acides aminés des positions 213, 262 et 316 sont localisés dans un environnement proche dans le contexte de la structure tridimensionnelle de E1. Il reste cependant à déterminer si la glycoprotéine E1 interagit directement avec CLDN1, ce qui n'a pas pu être démontré expérimentalement.

Il est intéressant de noter que dans le cadre d'une étude précédente, notre laboratoire avait réalisé une étude de mutagenèse dirigée des résidus cystéines de E1 dans le contexte du clone

infectieux JFH1. Étonnamment, ces mutants étaient toujours infectieux même s'ils étaient atténués (Wahid et al., 2013), ce qui a permis leur étude fonctionnelle. Le phénotype le plus remarquable de ces mutants était qu'ils étaient plus sensibles à l'inhibition par le co-récepteur soluble CD81. Ce co-récepteur interagissant avec la glycoprotéine E2, cela montre que la glycoprotéine E1, de par son interaction avec E2, est capable de moduler la capacité de E2 à interagir avec CD81. Ajouté à l'observation que la glycoprotéine E1 joue également un rôle dans la reconnaissance de CLDN1, ces résultats supportent un rôle de E1 dans la modulation de l'interaction avec les récepteurs du HCV.

Le phénotype le plus intéressant identifié au cours de ce travail concerne le mutant D263A. En effet, cette mutation a conduit à la production de particules virales sécrétées non infectieuses et dépourvues d'ARN génomique, suggérant une interaction indirecte entre la glycoprotéine E1 et l'ARN génomique, probablement par l'intermédiaire de la protéine de capsid. Il a été montré précédemment que la protéine de capsid du HCV, exprimée en bactéries, est capable de s'auto-assembler en nucléocapsides (Kunkel et al., 2001). Cependant, dans ce cas, des molécules d'ARN viral ou non viral étaient associées aux particules sécrétées. De plus, l'assemblage intracellulaire en cellules eucaryotes de capsides du HCV a également été décrit (Blanchard et al., 2002). Cependant, ces particules n'étaient pas sécrétées, et il a été montré qu'elles présentaient des phénomènes de bourgeonnement abortif. Dans le cas du mutant D263A, nous avons observé la production de particules sécrétées qui contiennent au moins la protéine de capsid mais pas de génome viral. De plus, la caractérisation de la protéine de capsid exprimée dans le contexte de ce mutant a montré qu'elle ne présentait pas de défaut d'oligomérisation. Il aurait également été intéressant de mettre en évidence la présence des protéines d'enveloppe associées à la particule virale sécrétée pour le mutant D263A et de caractériser les particules virales de ce mutant en microscopie électronique. Ceci n'a cependant pas pu être réalisé en raison de la faible quantité de particules virales produites dans nos conditions expérimentales et du fait que nous ne pouvions pas amplifier ce mutant non infectieux par réinfection.

Dans le cas du mutant D263A, la production de particules virales sécrétées non infectieuses et dépourvues d'ARN génomique, suggère une interaction tripartite entre la glycoprotéine E1, la protéine de capsid et l'ARN génomique. Il a été précédemment montré que la glycoprotéine E1 interagissait avec la protéine de la capsid dans le contexte d'un système d'expression hétérologue (Nakai et al., 2006). Dans le cas de notre mutant D263A, nous pouvons spéculer que, en raison de la perte d'interaction avec E2, la glycoprotéine E1 pourrait interagir directement avec la protéine de capsid en l'absence d'interaction entre celle-ci et l'ARN

génomique, conduisant ainsi à la production de particules virales dépourvues d'ARN génomique. De façon intéressante, nous avons également observé une diminution de la colocalisation de la glycoprotéine E1 avec l'ARN viral dans le contexte du mutant D263A, suggérant que E1 pourrait jouer un rôle dans le recrutement de l'ARN génomique au site d'assemblage, grâce à son interaction avec la protéine de capsid. Ces données montrent donc que la glycoprotéine E1 joue un rôle majeur non seulement au niveau de l'entrée mais également dans l'assemblage des particules virales du HCV. D'un point de vue structural, le résidu D263 se trouve dans le feuillet $\beta 5$ (figure 40) avec son domaine carboxylique qui se situe au centre des liaisons hydrogènes des chaînes latérales des résidus R237, W239 et H261 (figure 11-B du papier *résultats partie I*). Ces interactions polaires pourraient être impliquées dans la stabilisation des chaînes latérales de D263, R237, W239 et H261 vers une conformation de E1 appropriée pour interagir avec un partenaire biologique essentiel. L'ensemble de ces données indique pour la première fois une interaction indirecte entre une protéine d'enveloppe et l'ARN génomique viral.

Après une première étude fonctionnelle focalisée sur la région N-terminale de E1, nous avons réalisé la caractérisation fonctionnelle de la région 272 à 311 a.a qui présente un peptide de fusion potentiel (figure 40). Dans le modèle de structure proposé par Freedman et collaborateurs (Freedman et al., 2017), cette région est formée par une hélice alpha (275 à 286 a.a.) qui correspond au peptide de fusion suivi par deux feuillets β (290 à 303 a.a.). Ce peptide de fusion est exposé vers l'extérieur de la protéine mais aucun anticorps neutralisant ciblant cette région n'a pu être identifié, suggérant ainsi que ce peptide est protégé de la réponse immunitaire par des apolipoprotéines (Freedman et al., 2017). De façon intéressante, des travaux précédents basés sur l'utilisation de molécules antivirales avaient montré l'apparition de mutations de résistance dans cette région de E1 au niveau des résidus Q289 et F291 (Perin et al., 2016 ; Vausselin et al., 2016). De plus, un peptide synthétique correspondant à cette région présente une capacité à interagir avec des membranes et à induire des perturbations lipidiques, en accord avec un rôle potentiel d'interaction avec la membrane de l'hôte pendant l'étape de fusion (Pérez-Berna et al., 2009). Une étude plus récente a montré que la délétion de la région du peptide de fusion potentiel aboutissait non seulement à une perte d'infectiosité du virus mais aussi réduisait les niveaux de l'ARN et de la protéine de capsid du HCV dans le surnageant (Tong et al., 2017). Ce résultat suggère que cette région de E1 pourrait également jouer un rôle important dans la morphogénèse du virus en plus de sa contribution à l'entrée du HCV (Drummer et al., 2007 ; Lavillette et al., 2007). Il était donc important d'étudier le rôle fonctionnel de cette région dans le contexte du virus JFH1 afin de mieux

comprendre son rôle éventuel au cours de l'entrée virale.

Comme précédemment, nous avons généré une série de mutants dans la région correspondant au peptide de fusion potentiel, en remplaçant l'acide aminé ciblé par une alanine dans le contexte d'un clone infectieux du virus HCV permettant ainsi d'étudier l'effet de ces mutations dans le contexte du cycle infectieux viral. Nous avons ensuite analysé l'effet de ces mutations sur l'infectiosité du virus et nous avons utilisé différentes approches biochimiques pour la caractérisation des mutants obtenus. Comme attendu, aucune de nos mutations n'affectait la réplication génomique. Cependant, parmi les 9 mutants obtenus, 8 étaient partiellement ou complètement affectés dans leur infectiosité, montrant un rôle important pour cette région au cours du cycle infectieux du HCV.

Les approches biochimiques ont montré que, pour la plupart de ces mutants, la perte d'infectiosité était associée à un défaut de repliement de E1 et/ou d'interaction entre E1 et E2. Une perte d'interaction entre E1 et E2 a été observée pour les résidus G278A, D279A, L286A, Q302A, E303A et Y309A. Ces résultats confirment l'implication de la région des résidus de 290 à 306 dans l'hétérodimérisation de E1 et E2 comme suggéré dans le modèle de Freedman (Freedman et al., 2017). En effet, les glycoprotéines E1 et E2 coopèrent pour former un hétérodimère non covalent qui forme l'unité fonctionnelle de l'enveloppe virale (Wahid et al., 2013). Cependant, aucune des mutations de E1 n'affectait le repliement de la glycoprotéine E2 car celle-ci était détectable dans nos expériences de précipitation avec le co-récepteur CD81. Parmi les virus caractérisés, les deux mutants G282A et G311A n'ont pas montré de défaut de repliement ou d'assemblage de l'hétérodimère E1E2, indiquant ainsi que la mutation au niveau de ces deux positions n'affecte pas la structure de E1 et E2, ni l'interaction entre ces deux glycoprotéines. Il est intéressant de noter que la mutation G282A a été récemment caractérisée dans le contexte du système HCVpp (Tong et al., 2017). Dans ce contexte, la mutation G282A conduisait à une diminution d'infectiosité sans toutefois aboutir à une perte totale du pouvoir infectieux comme nous avons pu l'observer dans le système HCVcc.

Parmi les mutants de la région du peptide potentiel de fusion, deux présentaient une infectiosité résiduelle suffisante pour une caractérisation fonctionnelle. Il s'agit des mutants L286A et E303A. Nous avons réalisé des tests de neutralisation avec des anticorps monoclonaux anti-E1 et/ou E2 ainsi qu'un test d'inhibition d'infection avec une forme soluble du récepteur CD81 afin de mettre en évidence d'éventuels changements au niveau de la structure quaternaire des protéines d'enveloppe, mais aucun changement de phénotype n'a été observé dans ces expériences. Nous avons ensuite évalué ces mutants dans un test d'infection

en présence d'anticorps anti-récepteur. Aucun changement phénotypique n'a été observé en présence des anticorps anti-CD81 ou anti-SR-B1. Par contre, les mutants L286A et E303A présentait une sensibilité accrue à l'inhibition par l'anticorps anti-CLDN1. Ces résultats contrastent avec ceux observés pour les mutants T213A et I262A qui montraient une diminution de la dépendance à CLDN1, mais ils renforcent l'hypothèse du rôle majeur joué par la glycoprotéine E1 dans l'interaction du HCV avec le co-récepteur CLDN1. Devant ces observations, nous avons tenté de mettre en évidence une interaction directe entre la glycoprotéine E1 et CLDN1 dans une approche biochimique. Malheureusement, nos expériences se sont révélées infructueuses. Ceci pourrait être dû à la présence de détergent dans nos conditions expérimentales qui pourrait affecter cette interaction. Alternativement, nous ne pouvons pas exclure qu'une première interaction du complexe E1E2 avec le co-récepteur CD81 soit nécessaire pour que la glycoprotéine E1 puisse interagir avec CLDN1. Des approches expérimentales complémentaires seront donc nécessaires afin de mieux comprendre l'implication de la glycoprotéine E1 dans l'interaction avec le co-récepteur CLDN1.

Dans le cadre de cette deuxième étude, un mutant a particulièrement attiré notre attention. Il s'agit du mutant G311A qui était non infectieux tout en présentant un bon niveau de sécrétion de particules virales quantifié par la présence de la protéine de capsid. Contrairement au mutant D263A, les particules virales du mutant G311A présentaient de l'ARN génomique, mettant en évidence un défaut d'entrée cellulaire pour ce virus. Il reste cependant à déterminer si cette mutation affecte réellement l'étape de fusion. En effet, nous ne pouvons pas exclure un effet de cette mutation sur une étape antérieure telle que par exemple l'attachement aux co-récepteurs. Cependant, le fait que le complexe E1E2 soit précipité par la forme soluble de CD81 indique une reconnaissance correcte de ce co-récepteur. Au vu de nos résultats, nous ne pouvons pas exclure un effet sur l'interaction du virus avec CLDN1. Afin d'aller plus loin dans la caractérisation de ce mutant, nous prévoyons de l'étudier dans le contexte du système HCVpp afin de confirmer définitivement son effet sur l'entrée virale. De plus, cet outil pourrait nous permettre d'envisager des études complémentaires afin d'identifier plus précisément l'étape d'entrée affectée par la mutation G311A. Il est à noter également que l'acide aminé G311 n'est pas localisé directement dans la région potentielle du peptide de fusion. Il est en effet localisé à une vingtaine de résidus de ce segment peptidique dans le contexte de la séquence primaire de E1. Cela pourrait signifier que le peptide de fusion n'est pas exactement localisé dans la région initialement identifiée. Alternativement, nous ne pouvons exclure un effet à distance de cette mutation dans le processus de fusion.

En conclusion de cette thèse, nos études nous ont permis de consolider l'hypothèse suggérant des relations interdépendantes entre les glycoprotéines E1 et E2. Nous avons en effet identifié de nouvelles régions de E1 impliquées dans des interactions avec la glycoprotéine E2. Nous avons également mis en évidence le rôle de la glycoprotéine E1 dans la modulation de l'interaction avec le co-récepteur CLDN1. Nos travaux nous ont aussi permis de mettre en évidence pour la première fois une interaction indirecte entre la glycoprotéine E1 et l'ARN viral du HCV au cours de l'étape d'assemblage du virion. Enfin, nous avons également identifié une région de la glycoprotéine E1 impliquée dans l'entrée virale. Pour aller plus loin dans l'interprétation de l'ensemble de nos travaux il serait souhaitable d'avoir accès à une structure tridimensionnelle de l'hétérodimère E1E2 afin de mieux comprendre la relation structure-fonction de cette nouvelle classe de protéine de fusion.

Méthodologie

Notre étude vise à investiguer l'importance de la région N-terminale (résultats partie I) et du peptide de fusion potentiel (résultats partie II) présent dans E1, lors du cycle infectieux du HCV. Afin d'atteindre ce but nous avons remplacé les acides aminés conservés de ces régions par des résidus alanine. Les tests de caractérisation des mutants générés non décrits dans l'article : Identification of novel functions for hepatitis C virus envelope glycoprotein E1 in virus entry and assembly, sont détaillés ci dessous.

1. Clonage des virus mutants

Le virus HCV utilisé dans cette étude est une version modifiée de l'isolat JFH1 (génotype 2a, numéro d'accès GenBank AB237837) (Wakita et al., 2005 ; Delgrange et al., 2015), fourni par T. Wakita (Institut national des maladies infectieuses, Tokyo, Japon) (Deleersnyder et al., 1997). Le plasmide pJFH1 contenant la séquence codante de la souche JFH1 a été utilisé comme matrice pour effectuer les PCR en utilisant des amorces spécifiques contenant les mutations en alanine. Trois PCR ont été réalisées pour produire l'insert contenant la mutation (figure 50). Une première PCR a été réalisée avec une amorce sens contenant la mutation et une amorce antisens terminant par le site de restriction BsiWI présent dans la séquence du gène E1 Cette PCR a permis de générer le segment d'ADN en aval de la mutation. Une deuxième PCR réalisée en parallèle avec une amorce sens commençant par le site de restriction EcoRI et une amorce antisens contenant la mutation a permis d'obtenir le fragment d'ADN en amont de la mutation. Enfin, une troisième PCR de fusion a été réalisée avec les amorces sens contenant le site EcoRI et antisens contenant le site BswI afin de fusionner les deux fragments d'ADN.

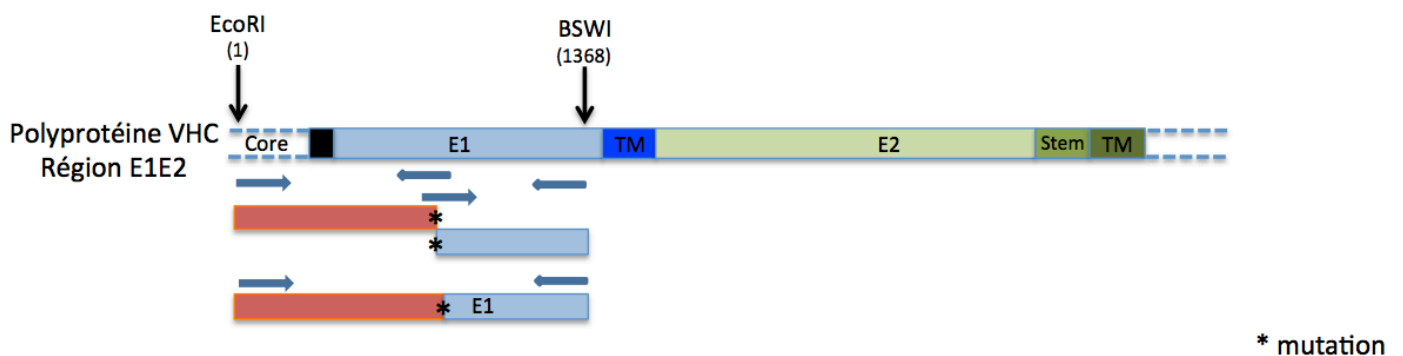


Figure 50. La génération des fragments d'ADN mutés.

Le fragment PCR EcoRI/ BsiWI obtenu après la PCR de fusion a ensuite été digéré par les enzymes de restriction EcoRI et BsiWI. Après purification sur gel d'agarose, ce fragment a été ligué dans le vecteur pJFH1 digéré EcoRI/ BsiWI.

Après ligation, les constructions ont été introduites dans des bactéries E. coli compétentes afin d'amplifier l'ADN plasmidique. Le criblage des colonies porteuses de la construction a été réalisé par PCR sur colonies (figure 51). Les plasmides des colonies positives identifiées ont été extraits et séquencés afin de vérifier que l'insert contenait uniquement la mutation désirée.

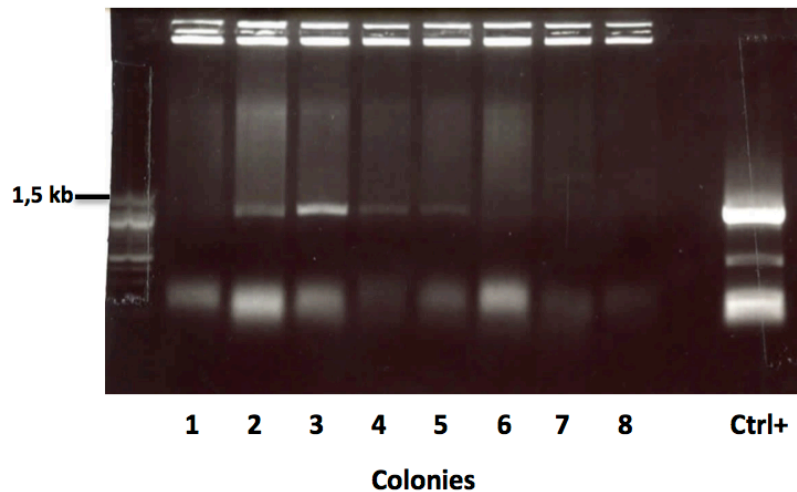


Figure 51. Le résultat de la PCR sur colonies. Les colonies 2, 3, 4 et 5 donnent une bande sur gel d'agarose 1% après PCR. Ces colonies sont porteuses de la construction et contiennent la mutation désirée. La PCR a été réalisé avec un primer spécifique contenant la mutation et un primer contenant le site de restriction de l'enzyme EcoRI.

2. Tests d'inhibition de l'expression des récepteurs par siRNA

Les cellules Huh7 ont été transfectées avec les siRNA ciblant les gènes des récepteurs SR-B1 et CD81 en plaques de 6 puits. Pour chaque puit, 3 μ l de l'agent de transfection lipofectamine RNAiMAX (life technologie ref# 13778-150) ont été dilués dans 500 μ l de PBS1X stérile. Le mélange a été incubé 3 minutes à température ambiante. Durant l'incubation, 2,5 μ l de siRNA (20 nM) ont été ajoutés dans chaque puit d'une plaque 6 puits. 500 μ l de la solution diluée de PBS1X / lipofectamine ont été ajoutés sur les 2,5 μ l de siRNA au milieu du puit. Ce mélange a été incubé 30 min à température ambiante. Durant cette

incubation, les cellules Huh7 ont été trypsinées et comptées. Dans chaque puit, 3 ml de milieu DMEM complet contenant 10^5 cellules ont été ajoutés et les cellules ont ensuite été incubées pendant 2 jours à 37°C. Par la suite, les cellules ont été inoculées dans des plaques de 96 puits. Le lendemain, ces cellules ont été infectées par les virus sauvage et mutants. À 72h post-infection, les cellules ont été fixées et analysées par immunofluorescence pour quantifier les niveaux d'infection.

3. Concentration des virus par précipitation au polyéthylène glycol (PEG) et quantification de l'ARN viral

Environ 4×10^6 de cellules Huh7 ont été électroporées avec 10 µg d'ARN viraux sauvage et mutants. À 6h post-électroporation, le surnageant a été aspiré et les cellules ont été lavées 2 fois avec du PBS1X stérile puis incubées dans du milieu DMEM complet (cette étape est essentielle afin d'éliminer tout ARN non incorporé dans les cellules au cours de l'électroporation). A 48h post-électroporation, l'efficacité d'électroporation a été évaluée par immunofluorescence anti-E1. Les ARN intracellulaires ont été extraits avec le kit d'extraction NucleoSpin RNA, Ref. 740955.250, Macherey-Nagel. En parallèle, les surnageants ont été collectés et les virus extracellulaires précipités par addition de PEG (6000) à une concentration finale de 8%. Le mélange a été incubé sur glace pendant 1h avec agitation et une nuit à 4°C. La solution a été centrifugée à 8000 trs/min pendant 25 min, le culot a été resuspendu avec 10 ml de surnageant et re-centrifugé à 8000 trs/min pendant 20 min. Enfin, le surnageant a été éliminé et le culot a été resuspendu dans 11 mL de PBS1X froid. Après 30 minutes d'incubation à 4°C, la suspension virale a été centrifugée pendant 5 min à 2000 trs/min de manière à éliminer le matériel insoluble. Les virus ont ensuite été culottés par ultracentrifugation à 27000 trs/min à 4°C (rotor SW41). Le surnageant a été retiré soigneusement et le culot obtenu a été resuspendu dans 140 µL de DMEM complet. L'ARN viral a été isolé à partir de cette suspension en utilisant le kit QIAamp Viral RNA mini Kit, Cat. No.52906, QIAGEN. La quantification de l'ARN viral intra et extracellulaire a été faite par RTqPCR.

Annexe

Identification of novel functions for hepatitis C virus envelope glycoprotein E1 in virus entry and assembly

Juliano Haddad^{1,2}, Yves Rouillé¹, Xavier Hanouille³, Véronique Descamps⁴, Monzer Hamze², Fouad Dabboussi², Thomas F. Baumert⁵, Gilles Duverlie⁴, Muriel Lavie^{1*}, Jean Dubuisson^{1*}

1- Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019 - UMR 8204 - CIIL- Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, F-59000 Lille, France.

2- Laboratoire Microbiologie Santé et Environnement (LMSE), Ecole Doctorale en Sciences et Technologie, Faculté de Santé Publique, Université Libanaise, Tripoli, Liban;

3- University of Lille, CNRS, UMR 8576, UGSF, Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, F-59000 Lille, France

4- Laboratoire de Virologie EA4294, Centre Hospitalier Universitaire d'Amiens, Université de Picardie Jules Verne, Amiens, France;

5- Inserm, U1110, University of Strasbourg, Pôle Hépatite-digestif-Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France;

Keywords: hepatitis C virus; glycoprotein; envelope proteins; viral entry; viral assembly

Running title: HCV glycoprotein E1 functions

*Corresponding authors

E-mail: jean.dubuisson@ibl.cnrs.fr

E-mail: muriel.lavie@ibl.cnrs.fr

Address : Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Prof Calmette, 59021 Lille Cedex, France

Author contributions

Conceived and designed the experiments: JH, YR, MH, FD, GD, ML, JD

Performed the experiments: JH, YR, VD, ML

Provided reagents and edited the manuscript: TFB

Analyzed the data: JH, YR, XH, ML, JD

Wrote the paper: JH, ML, JD

Abstract

Hepatitis C Virus (HCV) envelope glycoprotein complex is composed of E1 and E2 subunits. E2 is the receptor-binding protein as well as the major target of neutralizing antibodies, whereas the functions of E1 remain poorly defined. Here, we took advantage of the recently published structure of the N-terminal region of E1 ectodomain to interrogate the functions of this glycoprotein by mutating residues within this 79 amino acid region in the context of an infectious clone. The phenotypes of the mutants were characterized to determine the effects of the mutations on virus entry, replication and assembly. Furthermore, biochemical approaches were also used to characterize the folding and assembly of E1E2 heterodimers. Thirteen out of nineteen mutations led to viral attenuation or inactivation. Interestingly, two attenuated mutants, T213A and I262A, were less dependent on claudin-1 for cellular entry in Huh-7 cells. Instead, these viruses relied on claudin-6, indicating a shift in receptor dependence for these two mutants in the target cell line. An unexpected phenotype was also observed for mutant D263A which was no longer infectious but still showed a good level of core protein secretion. Furthermore, genomic RNA was absent from these non-infectious viral particles, indicating that D263A mutation leads to the assembly and release of viral particles devoid of genomic RNA. Finally, a change in subcellular co-localization between HCV RNA and E1 was observed for D263A mutant. This unique observation highlights for the first time a crosstalk between HCV glycoprotein E1 and the genomic RNA during HCV morphogenesis.

Importance

Hepatitis C virus (HCV) infection is a major public health problem worldwide. It encodes two envelope proteins, E1 and E2, which play a major role in the life cycle of this virus. E2 has been extensively characterized, whereas E1 remains poorly understood. Here, we investigated E1 functions by using site-directed mutagenesis in the context of the viral life cycle. Our results identify unique phenotypes. Unexpectedly, two mutants clearly showed a shift in receptor dependence for cell entry, highlighting a role for E1 in modulating HCV particle interaction with cellular receptor(s). More importantly, another mutant led to the assembly and release of viral particles devoid of genomic RNA. This unique phenotype was further characterized and we observed a change in subcellular co-localization between HCV RNA and E1. This unique observation highlights for the first time a crosstalk between a viral envelope protein and the genomic RNA during morphogenesis.

Introduction

Hepatitis C virus (HCV) infection is a major public health problem with around 170 million people infected worldwide (1). HCV infection has a high propensity for establishing a chronic infection and, in the long term, this can lead to cirrhosis and hepatocellular carcinoma.

Although recent improvements in the standard of care therapy have been achieved, the available treatments remain very expensive and far from being accessible to the majority of HCV-infected patients (2).

HCV is a plus-stranded RNA virus which belongs to Hepacivirus genus in the *Flaviviridae* family. The viral genome contains a single open reading frame generating a polyprotein which is sequentially processed by both cellular and viral encoded proteases into ten mature viral proteins. Among these polypeptides, the structural proteins (core, E1 and E2) are the components of the viral particle (reviewed in (3)).

The E1 and E2 envelope glycoproteins are two highly glycosylated type I transmembrane proteins, each with an N-terminal ectodomain and a well-conserved C-terminal transmembrane domain. By being part of the viral particle, HCV envelope glycoproteins E1 and E2 play an essential role in virion morphogenesis as well as in HCV entry into liver cells. These two steps necessitate timely and coordinated control of HCV glycoprotein functions. Furthermore, HCV entry is a complex multistep process involving at least four major entry factors. They include scavenger receptor BI (SR-BI)(4), tetraspanin CD81 (5) and tight-junction proteins claudin-1 (CLDN1) (6), and occludin (OCLN) (7).

Until recently, research on HCV glycoproteins has been mainly focused on E2 because it is the receptor-binding protein interacting with CD81 and SR-BI. E2 is also the major target of neutralizing antibodies and it was postulated to be the fusion protein (reviewed in (8)).

However, the structure of E2 does not fit with what one would expect for a fusion protein (9, 10), suggesting that E1 alone or in association with E2 might be responsible for the fusion

step. Interestingly, several studies characterizing novel inhibitors of late steps of HCV entry have shown that some resistant mutations can be found in E1 (11-13), re-enforcing the hypothesis that this protein plays a major role during the fusion process. Furthermore, E1 also plays a role in modulating the exposure of the CD81-binding region on E2 (14). Together, these observations indicate that E1 plays a more important role than previously thought in the HCV life cycle. It is therefore essential to better understand how E1 plays an active role in HCV entry and assembly.

Recently, the crystal structure of the N-terminal half of E1 ectodomain has been reported (15). This partial structure reveals a complex network of covalently linked, intertwined homodimers. We took advantage of this reported information to investigate the functional role of E1 by alanine replacement of residues in the context of an infectious clone. Among 19 mutants, eight showed reduced viral infectivity and five were no longer infectious. Interestingly, two attenuated mutants, T213A and I262A, showed a shift of dependence for virus entry factor from CLDN1 to CLDN6. Importantly, another mutation, D263A, which abolished virus infectivity, led to the secretion of viral particles devoid of genomic RNA but containing core protein and HCV glycoproteins, highlighting cross-talks between HCV glycoprotein E1 and the genomic RNA during HCV morphogenesis.

Results

Amino acid conservation in the N-terminal region of E1 ectodomain and mutagenesis

rationale. The secondary structures present in the N-terminal 79 amino acid residues of E1 are presented in Figure 1A (15). The analysis of the E1 amino acid sequence conservation among all HCV genotypes shows that the most conserved residues do not necessarily match with the secondary structure elements that have been identified in the crystallographic structure of the N-terminal domain of E1 ectodomain (Figure 1B). This highlights that both the secondary

structures and peculiar features of the loops, which contain crucial cysteine residues as well as glycosylation sites, are crucial for the biological function(s) of E1. It is worth noting that the less conserved region in the N-terminal region of E1 ectodomain corresponds to the disordered loop between β 4 to β 5 that was not seen in the electron density of the crystallographic structure.

Here, we mutated residues in the context of an infectious clone. The effects of mutation of cysteine residues and glycosylation sites have already been reported previously (14, 16), and these residues were therefore not included in this study. We produced a series of nineteen mutants in which residues were individually replaced by alanine residues, and we concentrated our study on structured segments (β 1 to β 5 and α -helix) or conserved amino acids located close to these secondary structures (Figure 1A). Mutations were introduced in a modified version of the plasmid encoding the full-length JFH1 genome in which the N-terminal E1 sequence has been modified to reconstitute the A4 epitope, which is present in E1 of genotype 1a (17), and therefore allows the identification of E1 of genotype 2a for which there is no antibody easily available. We did not introduce any mutation in β 2 since it contains A4 epitope sequence. It worth noting that the introduction of the A4 epitope had no effect on HCV infectivity (data not shown), indicating that this modification is not interfering with the phenotype of E1 mutants characterized in our study.

Effect of E1 mutations on HCV infectivity. We first determined whether our mutants are functional for replication. For this, we analyzed the expression of several HCV proteins at 48h post-electroporation. For all the mutants, the levels of expression of E2 and NS5A were similar to the wild-type virus (Figure 2A). However, we observed a weaker signal for the E1 glycoprotein in the case of Q193A and V194A mutants, which is likely due to a weaker recognition of E1 by Mab A4 whose minimum epitope has been mapped immediately

downstream of these two residues. Together, our data indicate that our mutations do not affect HCV genome replication.

We then measured the effects of the mutations on the production of infectious virus by determining intra- and extra-cellular infectivities. As shown in Figure 2B, we observed three phenotypes for virus infectivity: (1) complete loss of infectivity, (2) no effect on infectivity or (3) reduced infectivity. In β 1 strand we observed a slight decrease in extracellular infectivity for Q193A and V194A, indicating that these mutations only slightly affect HCV infectivity. Four mutations (S208A, T213A, V220A and L221A) in the α -helix had only a slight effect or no effect at all on HCV infectivity, whereas the others had a drastic reduction in HCV infectivity (I212A and Q215A) or totally abolished it (W214A and H222A). Most mutants within the β -sheet (β 3 to β 5) showed no change in infectivity (G233A, M264A and V265A) or only a slight decrease (R231A, V240A, P244A and I262A). However, for two of them (W239A and D263A) infectivity was totally abolished. Overall, the intracellular infectivity profiles were similar to those observed for extracellular viruses, excluding any effect of the mutations on infectious particles release. This first analysis indicates that the α -helix and the β -sheet contain essential residues for HCV infectivity.

Determination of virion release. To determine the effect of mutations on viral secretion in the case of reduced or abolished infectivity, we measured the expression of core protein in cell lysates and supernatants. As shown in Figure 3A, the levels of intracellular core protein of the mutants were comparable to the wild-type, excluding any effect of the mutations on HCV genomic replication. In contrast, the levels of extracellular core protein were reduced for several mutants (Figure 3B). For most mutants, the levels of extracellular core protein paralleled those of extracellular infectivity (compare Figures 2 and 3). However, mutant D263A showed a good level of core release despite the absence of infectivity in the

supernatant (Figure 3B), which was confirmed in an additional experiment in the presence of a mutant virus defective in virus assembly (Figure 3C), suggesting that this mutation leads to the release of non-infectious viral particles.

Effect of E1 mutations on HCV glycoproteins folding and E1E2 heterodimerization.

Given the cooperativity between E1 and E2 on their respective folding, we analyzed the effect of E1 mutations on the formation of E1E2 heterodimers. To study the effect of mutations on the folding of E1 and E2, we used a pulldown assay using CD81-LEL that recognizes correctly folded E2. As shown in Figure 4A, E2 from all the mutants was recognized by CD81-LEL. However, a lower signal was observed for several of them: I212A, T213A, W214A, Q215A, V220A, H222A, R231, W239A and D263A. Importantly, for some mutants, the presence of E1 was not detected or barely detected (Q193A, V194A, I212A, H222A, W239A, I262A and D263A) or reduced (T213A). As discussed above, the weaker E1 signal for mutants Q193A and V194A is likely due to the involvement of these two residues in A4 epitope. For the other mutants, the absence or drastic decrease of E1 co-precipitation suggests that these mutations affect the interaction between E1 and E2, at least in the context of properly folded E2. Since these mutants (I212A, H222A, W239A, I262A and D263A) are also affected in their infectivity (Figure 2B), our data suggest that the assembly defect of the E1E2 heterodimer could be responsible for the decrease in infectivity. However, in the case of I262A mutant, infectivity was only 1 Log₁₀ lower than the wild-type (Figure 2B), suggesting that the residual interaction between E1 and E2 is sufficient to maintain a certain level of infectivity. In contrast, E1 and E2 from mutants W214A and Q215A were precipitated by CD81 despite loss of infectivity, suggesting that the functional defect for these mutants is not due to a global effect on E1E2 folding, but rather on the virion assembly itself.

To further characterize the folding of E1E2 complex, we also performed an immunoprecipitation experiment with conformation-sensitive Mabs. We first used Mab AR5A that recognizes a conformational epitope shared between E1 and E2 (18). For five of our mutants (I212A, H222A, W239A, I262A and D263A), HCV glycoproteins were not detected or weakly recognized by Mab AR5A (Figure 4B), which correlated with the data obtained with CD81 pulldown of E1E2. Since these mutants were also altered in their infectivity, one can expect that alteration in protein folding is responsible for the phenotype of these viruses.

Finally, we also used the conformation sensitive anti-E1 Mab IGH526 whose core epitope is located at amino acid positions 314-324 (19). For this analysis, we focused mainly on mutants showing alterations in infectivity. As shown in Figure 4C, a decrease in the recognition of E1 was observed for I212A, T213A, H222A, W239A and D263A mutants, which correlated with an alteration in recognition of E1E2 complex by CD81 and AR5A (Figures 4A and B). It is noteworthy, that I262A mutant was relatively well recognized by IGH526 Mab (Figure 4C), which contrasts with the altered recognition by CD81 and AR5A, suggesting that E1 might have achieved an advanced state of folding for this mutant despite alterations in E1E2 interactions. A decrease in E1 recognition by Mab IGH526, which correlated with a slight reduction of recognition by CD81, was also observed for R231A mutant (Figure 4C). This could again explain the slight decrease in infectivity observed for this mutant (Figures 4A).

Effect of E1 mutations on sensitivity to antibody neutralization and inhibition by CD81 co-receptor. The above analyzes of the effects of E1 mutations on the folding of the envelope proteins were performed in the context of intracellular proteins. However, incorporation of the envelope glycoproteins on the surface of the viral particle during the assembly process leads to conformational changes that occur in the quaternary structure of these proteins (15, 20).

The biochemical analysis of the glycoproteins associated with the viral particle are not easily performed because they require high amounts of viral particles. A more sensitive alternative approach is to determine the sensitivity of the mutant viruses to inhibition mediated by the presence of CD81-LEL or neutralizing Mabs. We therefore used CD81-LEL as well as Mabs AR5A and IGH526 for these experiments. In these analyses, we focused on infectious mutants showing a decrease in infectivity of approximately 1 log₁₀ (T213A, R231A, I262A) and S208A mutant was used as control. Interestingly, we observed a strong decrease in sensitivity to inhibition by CD81-LEL, AR5A and IGH526 for T213A and I262A mutants (Figure 5). These results indicate conformational changes in the envelope proteins present on the surface of these two mutants, which are in line with the alterations observed in our biochemical approach (Figure 4), suggesting a similar effect of the mutations on the conformation of HCV glycoproteins present on the surface of the viral particle. However, for some mutants, discrepancies were observed between biochemical analyses and neutralization results. Indeed, R231A mutant showed some alteration in the biochemical approach, but was neutralized at the wild-type level. On the opposite, I262A mutant was well recognized by IGH526 in the immunoprecipitation experiment, but was much less sensitive to neutralization by this antibody. This indicates that the biochemical results do not necessarily parallel the functional phenotype.

Effect of E1 mutations on the recognition of HCV receptors. To further characterize the phenotype of T213A, R231A and I262A mutants, we analyzed their dependence on known receptors. For this, we analyzed the sensitivity of our mutants to inhibition by anti-receptor Mabs previously reported to affect HCV entry. Similar dose-dependent decreases in infectivity were observed for mutant (S208A, T213A, R231A and I262A) and wild-type viruses in the presence of anti-CD81 Mab JS81 or anti-SR-BI Mab C167 (Figure 6A and B).

In contrast, T213A and I262A mutants were less inhibited by anti-CLDN1 Mab OM8A9-A3 (Figure 6C), suggesting that these viruses were less dependent on CLDN1 to infect Huh-7 cells. Since these cells also express CLDN6, another tight-junction protein that can be used by some viruses in the absence of CLDN1 (21), we also tested the sensitivity of T213A and I262A mutants to inhibition by anti-CLDN6 Mab 342927. As shown in Figure 6D, T213A and I262A mutants were more sensitive than the wild-type virus to inhibition by anti-CLDN6 Mab, whereas S208A and R231A mutants showed the same profile as the wild-type virus (data not shown). Furthermore, when we co-incubated these mutants with both anti-CLDN1 and anti-CLDN6 Mabs, T213A and I262A mutants were inhibited to a similar extent as the wild-type virus (Figure 6E). In the absence of antibodies against OCLN, we used a cell line knocked out for this receptor (22) to determine the dependence of our mutants to OCLN for virus entry. None of our mutants were able to infect this cell line (data not shown), indicating a similar dependence on OCLN. Altogether, our data indicate that T213A and I262A mutations induce a shift in receptor usage from CLDN1 toward CLDN6.

Characterization of the D263A mutant. Since it had lost infectivity but showed a good level of core protein secretion, D263A mutant was further characterized. For this, we analyzed the released viral material on an iodixanol density gradient. As a negative control, we used a viral genome carrying a large in-frame deletion in E1E2 coding region known to affect the release of viral particles (Δ E1E2). The different fractions obtained after gradient sedimentation were analyzed to determine infectivity as well as the content in core protein and genomic RNA. As shown in Figure 7B, core protein of the wild-type virus showed two peaks, one in fractions 1-2 and the other one in fractions 5-7. Fractions 1-2 corresponded to the peak of infectivity and the first peak of genomic RNA, whereas fractions 5-7 corresponded to the second peak of genomic RNA which was non-infectious (Figure 7A). Although core protein of D263A

mutant was detected in fractions 1-9, the majority peaked in fractions 5-7 together with the non-infectious peak of the wild type-virus (Figure 7A). Surprisingly, HCV RNA was at background level for D263A mutant very similarly to the control $\Delta E1E2$ which is defective in virus assembly (Figure 7B). This was not due to the absence of viral replication since intracellular RNA levels were similar for both D263A mutant and wild-type virus (Figure 7C). Together, our data indicate that D263A mutation leads to the assembly and release of particulate material devoid of genomic RNA.

To further understand the molecular basis of the absence of genomic RNA in secreted virus particles in the context of D263A mutation, we investigated whether the core protein was able to oligomerize into capsid-like structures. Oligomerization of core proteins expressed by this mutant was analyzed on a iodixanol gradient by ultracentrifugation, as described in Materials and Methods. The core protein complexes of the wild-type were detected in fractions 6 to 8 (Figure 8). These fractions correspond to highly ordered multimeric complexes (23). A similar profile of sedimentation was observed with D263A mutant as well as with the assembly-defective control $\Delta E1E2$ (Figure 8). However, there was a slight shift towards lower density for D263A mutant. Furthermore, a small proportion of the core protein was found in fractions 2 and 3 for both mutants D263A and $\Delta E1E2$. This likely corresponds to monomeric and/or dimeric forms of the core protein as previously suggested (24). When the wild-type core protein was treated with 1% SDS before ultracentrifugation, only the monomeric form of the core protein was detected in fractions 1 and 2 at the top of the gradient. This profile is due to disruption of core protein complexes by SDS, as shown previously (23) (Figure 8). These results therefore suggest that the D263A mutation does not drastically affect core protein multimerization.

Finally, we recently showed that E1 forms homotrimers during the assembly process (20). We therefore also tested the capacity of D263A mutant to form such trimers, but we did not detect any defect in E1 trimerization (data not shown).

Subcellular localization of HCV proteins during the assembly process of D263A mutant.

Since D263 mutant leads to the production of viral particles devoid of genomic RNA, we further investigated the subcellular co-localization of HCV proteins to determine whether this mutation would induce a mislocalization of E1 glycoprotein. For this, Huh-7 cells were electroporated with D263A mutant RNA, and the cells were fixed with paraformaldehyde at 48h post-electroporation before being processed for immunofluorescence. E1 mutated at position D263 showed a co-localization with E2 similar to what was observed for the wild-type virus (Figure 9). Furthermore, there was no difference in core and NS5A co-localization with lipid droplets, the site where HCV assembly is supposed to take place (25). Finally, we also analyzed whether D263A mutation affects the colocalization of core or E1 with the viral RNA. For this, we analyzed the localization of HCV RNA by FISH. Although D263A mutation did not change the co-localization of core protein with HCV RNA (Figure 10A), a significant decrease in subcellular co-localization between HCV RNA and E1 was observed for this mutant (Figure 10B and C), supporting the hypothesis that E1 could play a role in the recruitment of HCV RNA during virus assembly

Discussion

For a long time, E1 remained poorly studied. However, recent structural studies on E2 suggest that E1 might play an active role in the fusion process (26), prompting us to initiate a functional study of this protein based on the recently published structure of its N-terminus (15). Our data identify residues in the α -helix and the β -sheet that are important for the

assembly and release of infectious viral particles. Characterization of our mutants also highlights crosstalks between E1 and E2 during HCV morphogenesis. Furthermore, neutralization experiments indicate that mutations in two of our mutants induce a shift in receptor usage from CLDN1 toward CLDN6. Finally, characterization of the mutant D263A shows that this virus leads to assembly and release of viral particles devoid of genomic RNA, indicating that E1 plays a role in the incorporation of HCV RNA into the nucleocapsid.

Several mutations in E1 affect the folding of E2. This is the case for I212A, T213A, H222A and W239A mutants, as shown by CD81 pulldown. CD81 is often used as a probe to determine the folding of E2 since its binding region is located in E2 and it is conformation dependent (27). HCV glycoproteins have been shown to assemble as a noncovalent E1E2 heterodimer (28), and these proteins are known to cooperate for the formation of a functional complex(29). The folding of E1 has indeed initially been shown to be dependent on the co-expression of E2 (30, 31). Later on, it was reported that E1 can also affect the folding of E2 (32, 33). Our observation that mutations in E1 can affect the recognition of E2 by CD81 is therefore in line with the fact that E1 can play an active role in the folding of E2 in the context of E1E2. It is however to be noted that E2 expressed alone is well recognized by CD81(5), suggesting that mutations in E1 can push E2 towards a conformation poorly recognized by CD81, which is in line with the crosstalks observed between these two proteins (34, 35). I212, T213 and H222 correspond to highly conserved residues located in the α -helix of E1 (Figure 11), whereas W239 belongs to the β 4 strand.

Several mutations in E1 affect E1E2 interaction. This is particularly the case for mutants W239A, I262A and D263A, as shown by the lack of E1 signal after CD81 pulldown.

Residues involved in E1E2 interactions have been identified in the transmembrane domains of these two proteins (36). Moreover, a study based on chimeric E1E2 heterodimers derived

from different genotypes has also recently identified residues in the ectodomain of E1, at positions 308, 330 and 345, as being involved in functional interactions between E1 and E2 (35). However, in the study of Douam and coworkers, no biochemical analysis was performed to determine the physical interaction between these two proteins. Amino acid residues W239A, I262A and D263A identified in our study as affecting E1E2 interaction are located in a β -sheet structure identified in the N-terminal region of E1 (Figure 11) (15). I262, D263 and W239 belong to the β 4 and β 5 strands respectively and are close in space in the structure of E1. Indeed the D263 residue is directly facing the W239 residue. Therefore, our data suggest that this β -sheet is involved in interactions with E2. Interestingly, D263 and W239, two highly conserved residues, are part of a rather hydrophobic surface that has been described by El Omari *et al.* as being likely involved in interaction with another protein partner (15). It has to be noted that one of our mutations, I262A, is not lethal for the virus, suggesting that alteration in E1E2 interactions does not necessarily abolish viral infectivity. However, for this particular mutant, E1E2 interaction was not totally abolished, and the remaining infectivity might be explained by this residual interaction. If I262 is close to D263 and W239 residues, its side-chain does not point out in the same direction. Indeed, the side-chains of D263 and W239 are exposed to the E1 surface, directly available to potentially interact with another protein, whereas the side-chain of I262 is buried in the E1 structure and makes hydrophobic contacts with the α -helix (Figure 11). Thus the side-chain of I262 is unlikely to be directly involved in the interaction with E2, and this may explain the peculiar phenotype observed for I262 mutant.

Our data indicate that mutations in E1 can affect the tropism of HCV for CLDN1. Indeed, T213A and I262A mutants preferentially use CLDN6 instead of CLDN1 in Huh-7 cells. A similar shift in receptor dependence has recently been reported for another E1 mutant that has been selected by long-term culturing and passage of the HCV Jc1 isolate through CLDN1 KO

Huh-7.5 cells (37). Together, these data point to a role for E1 in the HCV cell-entry process as a modulator of entry factor usage. It has been previously reported that many HCV isolates can naturally use both CDLN1 and CLDN6 for host cell entry (21, 38-40), so a change in receptor dependence from CLDN1 to CLDN6 is not entirely surprising. However, it is not clearly known whether E1 interacts directly with CLDN1. It has been reported that mutations in E1 that affect the infectivity of pseudoparticles bearing HCV glycoproteins can modulate the binding of these particles to CLDN1-expressing cells, suggesting a role for E1 in HCV glycoprotein interaction with CLDN1 (35). However, one cannot exclude that these E1 mutations may be functioning indirectly by influencing how E2 interacts with CLDN1. We have indeed already observed that mutations in E1 can affect E2-CD81 interaction, indicating that E1 plays a role in modulating the receptor binding capacity of E2 (14). The most surprising observation is that mutations located in different regions of the E1 primary sequence can affect the dependence on CLDN1. Indeed, the mutations identified in our work are at position 213 and 262 which belong to the α -helix and the β 5 strand respectively (Figure 1), whereas the mutation identified by the group of Evans is located at position 316 (37), which is located in the epitope of neutralizing Mab IGH526 (19). However, T213 in the α -helix and I262 in the β 5 strand are proximate in space in the E1 structure. Moreover, I262 establishes hydrophobic interactions with the α -helix that contribute to the folding back of this helix on the β -sheet of E1 (Figure 11). Interestingly, our biochemical and neutralization data indicate that both T213A and I262A mutations affect E1 recognition by IGH526, suggesting that amino acid positions 213, 262 and 316 might be in close proximity in the 3D structure of E1. Whether the alteration in CLDN1-dependence is clinically relevant remains to be determined.

The most surprising observation of our study is the production of HCV particles devoid of genomic RNA in the case of D263A mutation. The D263 amino acid is highly conserved.

Indeed, an aspartate residue is present at this position in 18 out of 19 reference sequences from all confirmed genotypes and subtypes (Figure 1B) as well as in 96% of the full E1 sequences from the euHCVdb (<https://euhecvdb.ibcp.fr/>)(41)23. It has been shown that, in a cell-free assay, HCV core proteins produced in bacteria self-assemble into nucleocapsids (42). However, in this case viral or nonviral RNA molecules were associated with the particles. Intracellular assembly of HCV capsids has also been described in the past (43). However, these particles were not secreted and they were shown to form abortive budding events. In our case, we detected secretion of viral particles that contain at least the core protein but no genomic RNA. Due to the low production of particles and the fact that we cannot amplify them by reinfection, we could not determine whether HCV envelope glycoproteins are associated with these particles. We presume that they should be present in the envelope. E1 has been shown to interact with the capsid protein in the context of a heterologous expression system, at least after oligomerization of the capsid protein (44). Together with our data, this suggests that E1 plays a major role in HCV particle assembly. In the context of our D263A mutant, one can speculate that due to loss of interaction with E2, E1 might be able to directly interact with the capsid protein in the absence of interaction with the genomic RNA. Interestingly, we also observed a decrease in subcellular co-localization between HCV RNA and E1 for D263A mutant which is in line with the hypothesis that, through its interaction with core protein, E1 might play a role in recruiting the genomic RNA. As already mentioned above, in the E1 structure, the D263 residue that is located in the β -sheet has its side chain exposed at the molecular surface (Figure 11). Interestingly, the D263 carboxylic function of its side chain is at the center of a hydrogen bonds network, which comprises the R237, W239 and H261 side chains (Figure 11B). This polar interaction network might be involved in the stabilization of D263, R237, W239 and H261 side chains toward an E1 conformation suitable to interact with an essential biological partner.

To conclude, our mutagenesis study highlights cross-talks between the E1 and E2 during HCV morphogenesis. Our data also indicate the role of E1 in modulating functional interactions between E1E2 complex and CLDN1. Finally, this study describes for the first time a cross-talk between E1 and the genomic RNA during HCV morphogenesis.

Materials and Methods

Cell culture. Huh-7 hepatoma cells (45) were grown in Dulbecco's modified essential medium (DMEM; Thermofisher) supplemented with glutamax, 10% fetal calf serum and non essential aminoacids (NEAA).

Antibodies. Anti-HCV monoclonal antibodies (Mabs) A4 (anti-E1) (46) and 3/11 (anti-E2; kindly provided by J. A. McKeating, University of Birmingham, Birmingham, UK)(47) were produced *in vitro* by using a MiniPerm apparatus (Heraeus) as recommended by the manufacturer. Anti-E1E2 Mabs AR5A (18) and anti-E1 Mab IGH526 (19) were kindly provided by M. Law (Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA). The anti-NS5A MAb 9E10 (48) and a polyclonal antibody (49) were a gift from C. M. Rice (Rockefeller University, New York, NY) and M. Harris (University of Leeds, United Kingdom), respectively. Anti-core Mab ACAP-27 (50) was kindly provided by J. F. Delagneau (Bio-Rad, France). Anti-SR-BI Mab C167 was a gift from A. Nicosia (Okairos, Rome Italy) (51). Anti-CLDN1 Mab OM8A9-A3 has been previously described (52). Commercially available anti-CD81 Mab JS81 (BD Pharmingen), anti-SR-BI polyclonal antibody (Abcam), anti-SR-BI Mab Cla-I (BD Biosciences), and anti-CLDN6 Mab clone 342927 (R&D Systems) were used in this work. Secondary antibodies used for immunofluorescence were purchased from Jackson Immunoresearch. Control anti-tubulin antibody was from Sigma.

Structural model of E1. The structural model of the N-terminal region of E1 ectodomain was constructed using the JFH1 amino acid sequence and the crystallographic structure of E1 from H77 strain (PDB code 4UOI, chain F) as template thanks to the Swiss-Model server (53).

Mutagenesis and virus production. The virus used in this study is a modified version of the JFH1 isolate (genotype 2a; GenBank accession number AB237837) (54), kindly provided by T. Wakita (National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan) (17). Mutants were generated by site-directed mutagenesis. Selected residues were replaced by alanines. The restriction enzyme XbaI was used to linearize plasmids encoding viral RNAs. The linearized plasmids were then treated with mung bean nuclease (New England BioLabs) with the aim of obtaining blunt-ended DNA. For *in vitro* transcription, 2 µg of linearized DNA was transcribed using the Megascript kit according to the manufacturer's protocol (Ambion). The *in vitro* transcription reaction mixture was set up and incubated at 37°C for 4 h, and transcripts were precipitated by the addition of equal volumes of LiCl and nuclease-free water. The mixture was chilled at -20°C for 30 min and then centrifuged at 4°C for 15 min at 14,000 g. The supernatants were then removed, and the RNA pellets were washed with 70% ethanol and resuspended in RNase-free water. Infectivity analyses were performed as previously described (14). Briefly, supernatants containing extracellular virus were removed at different times after electroporation, and cell debris was removed by centrifugation for 5 min at 10,000 x g. Infected cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS), harvested by treatment with trypsin, and intracellular viral particles were obtained after 4 freeze-thaw cycles. Cell lysates were clarified by centrifugation at 10,000 x g for 7 min. Clarified supernatants containing extracellular virus and intracellular virus were used for infection of naïve Huh-7 cells. Infected cells were then fixed with ice-cold methanol (100%) and immunostained with anti-E1 or anti-NS5A antibodies. The non replicative control HCV genome (GND) contained a GND mutation in the NS5B active site, as previously reported

(55). The assembly-deficient control of HCV (Δ E1E2) containing an in-frame deletion introduced into the E1E2 regions has been previously described (54).

Immunofluorescence. Immunofluorescence analyses were performed as previously described (24). Briefly, Huh-7 cells electroporated with 10 μ g of wild-type or mutant RNAs, were grown on 12-mm coverslips or in 96 well plates. After 48 h, the cells were washed twice with PBS and then fixed with cold methanol (100%) for 5 min. The methanol was removed by washing the cells twice with PBS. The cells were then blocked with 10% goat or horse serum for at least 10 min, followed by washing with PBS. The primary anti-E1, anti-E2 and anti-NS5A antibodies were diluted in 10% goat serum/horse serum, and the coverslips were incubated with antibodies at room temperature for 25 min. The cells were then washed 3 times in PBS. The secondary antibody was diluted in goat serum/horse serum (1/500), and coverslips were incubated with a Cy3-conjugated antibody for 20 min. The cells were washed again with PBS. Nuclei were stained with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). The coverslips were mounted on glass slides using 7 μ L of mounting medium (Mowiol 4-88, Calbiochem). Confocal microscopy was performed with a LSM 880 confocal laser-scanning microscope (Zeiss) using a x63/1.4 numerical aperture oil immersion lens. Double-label immunofluorescence signals were sequentially collected by using single fluorescence excitation and acquisition settings to avoid crossover. Images were processed by using Image J software.

Equilibrium density gradient analysis. Equilibrium density gradient analyses were performed as previously described (14) after concentration of viral preparation by polyethylene glycol precipitation as described (56). Briefly, viruses were harvested 48 h following electroporation. Approximately 80 mL of virus supernatants was precipitated using polyethylene glycol (PEG) 6000 to a final concentration of 8%. The mixture was shaken for 1 h on ice, centrifuged at 8,000 rpm (Beckman JLA-10.5 rotor) for 25 min, and then resuspended in 1 mL sterile PBS.

The virus was then loaded on a 10-50% iodixanol gradient. The gradients were spun for 16 h at 36,000 rpm in an SW41 rotor (Beckman) and fractionated from the top.

Core oligomerization. Huh-7 cells electroporated with mutant and wild-type RNA genomes were lysed at 48 h postelectroporation in lysis buffer (PBS/0.3% NP-40 and a protease inhibitor cocktail (Roche)) for 15 min at room temperature. Cell lysates were precleared by centrifugation at 14,000 rpm for 5 min at 4°C. Each sample was layered on top of 11 ml 10-50 % iodixanol gradient and centrifuged in a Beckman SW41 Ti rotor (Beckman) at 36,000 rpm for 16 h at 4°C. Fractions of 1 ml were collected from the top of each tube and analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting.

HCV core quantification. HCV core was quantified by a fully automated chemiluminescent microparticle immunoassay according to the manufacturer's instructions (Architect HCVAg; Abbott, Germany) as previously described (57, 58).

Western blotting. Western blotting experiments were performed as previously described (13). Cells were lysed in PBS lysis buffer (1% Triton X-100, 20 mM NEM, 2 mM EDTA, protease inhibitor cocktail; Roche). Cell lysates were then precleared by centrifugation at 14,000 x g for 5 min at 4°C. Protein samples were heated for 7 min at 70°C in Laemmli sample buffer. Following separation with SDS-PAGE, the proteins were transferred onto nitrocellulose membranes (Hybond-ECL; Amersham) and detected with specific antibodies. Following incubation with primary antibodies, the membranes were incubated with the corresponding peroxidase-conjugated anti-rat (Jackson), anti-rabbit (Amersham), anti-sheep (Amersham) or anti-mouse (Dako) antibodies. The proteins were then detected by enhanced chemiluminescence (ECL) (Amersham) as recommended by the manufacturer.

CD81 interaction and immunoprecipitation assays. CD81 pulldown and immunoprecipitation experiments were performed as previously described (59). Cells were lysed in PBS lysis buffer (1% Triton X-100, 20 mM NEM, 2 mM EDTA, protease inhibitor

cocktail; Roche). Cell lysates were then cleared by centrifugation at 14,000 x g for 15 min at 4°C. For CD81 pulldown, Glutathione-Sepharose beads (glutathione-Sepharose 4B; Amersham Bioscience) were washed twice with cold PBS to remove the storage buffer. For each cell lysate sample, 50 µL of glutathione beads was incubated with 10 µg of human CD81 (hCD81) large extracellular loop (LEL) glutathione S-transferase (GST) recombinant protein in 1 mL cold PBS containing 1% Triton X-100 for 2 h at 4°C. Following incubation, the glutathione-Sepharose beads were washed with cold PBS. Cell lysate samples containing E1E2 proteins were then incubated with CD81-LEL complexed with glutathione beads overnight at 4°C. The following day, the beads were washed five times with cold PBS and 1% Triton X-100. Finally, the beads were resuspended in 30 µL of Laemmli buffer. Samples were heated at 70°C and loaded onto 10% SDS-PAGE, followed by western blotting to reveal the proteins of interest. For immunoprecipitation, 70 µL of protein A Sepharose beads was incubated with 10 µg of Rabbit anti-human IgG (Dako) in 1 mL cold PBS and 1% Triton X-100 for 2 h at 4°C. In parallel, 100 µL of cell lysates were incubated with 2 µg of Mab AR5A (anti-E1E2) or Mab IGH526 (anti-E1) in 400 µL cold PBS and 1% Triton X-100 for 2 h at 4°C. Next, Protein A Sepharose beads were washed twice with cold PBS and 1% Triton X-100 and added to cell lysates. The mixture was then incubated for 90 min at 4°C. After incubation, the beads were washed five times with cold PBS and 1% Triton X-100. Finally, the beads were resuspended in 30 µL of Laemmli buffer. The presence of HCV envelope glycoproteins was then detected by western blotting.

Entry inhibition assays and neutralization assays. Viruses or cells were preincubated with human CD81-LEL, Mab AR5A, Mab IGH526 or anti-receptor antibodies for 2 h at 37°C. The viruses were then put in contact with Huh-7 cells. At 6 h post-infection, the inoculum was removed and the cells were further incubated for 72 h with complete medium. The cells were then processed for immunofluorescence to measure residual infectivity.

Fluorescence in situ hybridization (FISH) and colocalization with viral proteins. In Situ hybridization was performed as previously described (60). Briefly, cells were washed once with PBS and fixed with 500 μ l of 4% paraformaldehyde for 20 min at room temperature, followed by three times washing with PBS. Fixed cells were processed for FISH analysis, using the QuantiGene ViewRNA ISH Cell Assay (Affymetrix) as recommended by the manufacturer.

Graphs and statistics. Prism v5.0c (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA) software was used to prepare graphs and to determine statistical significance of differences between data sets using the Mann-Whitney test.

Acknowledgements

We thank J. F. Delagneau, M. Harris, M. Law, J. McKeating, A. Nicosia, C. Rice and T. Wakita for providing essential reagents. We also thank Sophana Ung for his help in preparing the figures. The immunofluorescence analyses were performed with the help of the imaging core facility of the BioImaging Center Lille Nord-de-France.

This work was supported by the French National Agency for Research on AIDS and Viral Hepatitis (ANRS) and the ANR through ERA-NET Infect-ERA program (ANR-13-IFEC-0002-01). Juliano Haddad was successively supported by a fellowship from the Lebanese development association and from the ANRS.

References

1. **Mohd Hanafiah K, Groeger J, Flaxman AD, Wiersma ST.** 2013. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: New estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. *Hepatology* **57**:1333–1342.
2. **Webster DP, Klenerman P, Dusheiko GM.** 2015. Hepatitis C. *The Lancet* **385**:1124–1135.
3. **Popescu CI, Riva L, Vlaicu O, Farhat R, Rouillé Y, Dubuisson J.** 2014. Hepatitis C Virus Life Cycle and Lipid Metabolism. *Biology* **3**:892–921.
4. **Scarselli E, Ansuini H, Cerino R, Roccasecca RM, Acali S, Filocamo G, Traboni C, Nicosia A, Cortese R, Vitelli A.** 2002. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J* **21**:5017–5025.
5. **Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R, Weiner AJ, Houghton M, Rosa D, Grandi G, Abrignani S.** 1998. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* **282**:938–941.
6. **Evans MJ, von Hahn T, Tscherne DM, Syder AJ, Panis M, Wölk B, Hatzioannou T, McKeating JA, Bieniasz PD, Rice CM.** 2007. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* **446**:801–805.
7. **Ploss A, Evans MJ, Gaysinskaya VA, Panis M, You H, de Jong YP, Rice CM.** 2009. Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature* **457**:882–886.
8. **Lavie M, Penin F, Dubuisson J.** 2015. HCV envelope glycoproteins in virion assembly and entry. *Future Virol* **10**:297–312.

9. **Khan AG, Whidby J, Miller MT, Scarborough H, Zatorski AV, Cygan A, Price AA, Yost SA, Bohannon CD, Jacob J, Grakoui A, Marcotrigiano J.** 2014. Structure of the core ectodomain of the hepatitis C virus envelope glycoprotein 2. *Nature* **509**:381–384.
10. **Kong L, Giang E, Nieuwma T, Kadam RU, Cogburn KE, Hua Y, Dai X, Stanfield RL, Burton DR, Ward AB, Wilson IA, Law M.** 2013. Hepatitis C Virus E2 Envelope Glycoprotein Core Structure. *Science* **342**:1090–1094.
11. **Perin PM, Haid S, Brown RJP, Doerrbecker J, Schulze K, Zeilinger C, von Schaewen M, Heller B, Vercauteren K, Luxenburger E, Baktash YM, Vondran FW, Speerstra S, Awadh A, Mukhtarov F, Schang LM, Kirschning A, Müller R, Guzman CA, Kaderali L, Randall G, Meuleman P, Ploss A, Pietschmann T.** 2016. Flunarizine prevents hepatitis C virus membrane fusion in a genotype-dependent manner by targeting the potential fusion peptide within E1. *Hepatology* **63**:49–62.
12. **Vausselin T, Calland N, Belouzard S, Descamps V, Douam F, Helle F, François C, Lavillette D, Duverlie G, Wahid A, Fénéant L, Cocquerel L, Guérardel Y, Wychowski C, Biot C, Dubuisson J.** 2013. The antimalarial ferroquine is an inhibitor of hepatitis C virus. *Hepatology* **58**:86–97.
13. **Vausselin T, Séron K, Lavie M, Mesalam AA, Lemasson M, Belouzard S, Fénéant L, Danneels A, Rouillé Y, Cocquerel L, Foquet L, Rosenberg AR, Wychowski C, Meuleman P, Melnyk P, Dubuisson J.** 2016. Identification of a New Benzimidazole Derivative as an Antiviral against Hepatitis C Virus. *J Virol* **90**:8422–8434.
14. **Wahid A, Helle F, Descamps V, Duverlie G, Penin F, Dubuisson J.** 2013. Disulfide Bonds in Hepatitis C Virus Glycoprotein E1 Control the Assembly and Entry

- Functions of E2 Glycoprotein. *J Virol* **87**:1605–1617.
15. **El Omari K, Iourin O, Kadlec J, Sutton G, Harlos K, Grimes JM, Stuart DI.** 2014. Unexpected structure for the N-terminal domain of hepatitis C virus envelope glycoprotein E1. *Nat Commun* **5**:1–5.
 16. **Helle F, Vieyres G, Elkrief L, Popescu CI, Wychowski C, Descamps V, Castelain S, Roingeard P, Duverlie G, Dubuisson J.** 2010. Role of N-linked glycans in the functions of hepatitis C virus envelope proteins incorporated into infectious virions. *J Virol* **84**:11905–11915.
 17. **Goueslain L, Alsaleh K, Horellou P, Roingeard P, Descamps V, Duverlie G, Ciczora Y, Wychowski C, Dubuisson J, Rouille Y.** 2010. Identification of GBF1 as a Cellular Factor Required for Hepatitis C Virus RNA Replication. *J Virol* **84**:773–787.
 18. **Giang E, Dorner M, Prentoe JC, Dreux M, Evans MJ, Bukh J, Rice CM, Ploss A, Burton DR, Law M.** 2012. Human broadly neutralizing antibodies to the envelope glycoprotein complex of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**:6205–6210.
 19. **Kong L, Kadam RU, Giang E, Ruwona TB, Nieuwma T, Culhane JC, Stanfield RL, Dawson PE, Wilson IA, Law M.** 2015. Structure of Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein E1 Antigenic Site 314–324 in Complex with Antibody IGH526. *J Mol Biol* **427**:2617–2628.
 20. **Falson P, Bartosch B, Alsaleh K, Tews BA, Loquet A, Ciczora Y, Riva L, Montigny C, Montpellier C, Duverlie G, Pécheur E-I, le Maire M, Cosset FL, Dubuisson J, Penin F.** 2015. Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein E1 Forms Trimers at the Surface of the Virion. *J Virol* **89**:10333–10346.

21. **Haid S, Grethe C, Dill MT, Heim M, Kaderali L, Pietschmann T.** 2014. Isolate-dependent use of claudins for cell entry by hepatitis C virus. *Hepatology* **59**:24–34.
22. **Shirasago Y, Shimizu Y, Tanida I, Suzuki T, Suzuki R, Sugiyama K, Wakita T, Hanada K, Yagi K, Kondoh M, Fukasawa M.** 2016. Occludin-Knockout Human Hepatic Huh7.5.1-8-Derived Cells Are Completely Resistant to Hepatitis C Virus Infection. *Biol Pharm Bull* **39**:839–848.
23. **Ai LS, Lee YW, Chen SS.** 2009. Characterization of Hepatitis C Virus Core Protein Multimerization and Membrane Envelopment: Revelation of a Cascade of Core-Membrane Interactions. *J Virol* **83**:9923–9939.
24. **Alsaleh K, Delavalle PY, Pillez A, Duverlie G, Descamps V, Rouille 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. *J Virol* **84**:12515–12528.
25. **Miyanari Y, Atsuzawa K, Usuda N, Watashi K, Hishiki T, Zayas M, Bartenschlager R, Wakita T, Hijikata M, Shimotohno K.** 2007. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol* **9**: 1089-1097.
26. **Li Y, Modis Y.** 2014. A novel membrane fusion protein family in *Flaviviridae*? *Trends Microbiol* **22**:176–182.
27. **Cocquerel L, Voisset C, Dubuisson J.** 2006. Hepatitis C virus entry: potential receptors and their biological functions. *J Gen Virol* **87**:1075–1084.
28. **Deleersnyder V, Pillez A, Wychowski C, Blight K, Xu J, Hahn YS, Rice CM, Dubuisson J.** 1997. Formation of native hepatitis C virus glycoprotein complexes. *J*

- Virology **71**:697–704.
29. **Lavie M, Goffard A, Dubuisson J.** 2007. Assembly of a functional HCV glycoprotein heterodimer. *Curr Issues Mol Biol* **9**:71–86.
 30. **Michalak JP, Wychowski C, Choukhi A, Meunier JC, Ung S, Rice CM, Dubuisson J.** 1997. Characterization of truncated forms of hepatitis C virus glycoproteins. *J Gen Virol* **78 (Pt 9)**:2299–2306.
 31. **Patel J, Patel AH, McLauchlan J.** 2001. The Transmembrane Domain of the Hepatitis C Virus E2 Glycoprotein Is Required for Correct Folding of the E1 Glycoprotein and Native Complex Formation. *Virology* **279**:58–68.
 32. **Brazzoli M, Helenius A, Fong SK, 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.
 33. **Cocquerel L, Quinn ER, Flint M, Hadlock KG, Fong SK, Levy S.** 2003. Recognition of native hepatitis C virus E1E2 heterodimers by a human monoclonal antibody. *J Virol* **77**:1604–1609.
 34. **Albecka A, Montserret R, Krey T, Tarr AW, Diesis E, Ball JK, Descamps V, Duverlie G, Rey F, Penin F, Dubuisson J.** 2011. Identification of New Functional Regions in Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein E2. *J Virol* **85**:1777–1792.
 35. **Douam F, Dao Thi VL, Maurin G, Fresquet J, Mompelat D, Zeisel MB, Baumert TF, Cosset FL, Lavillette D.** 2014. Critical interaction between E1 and E2 glycoproteins determines binding and fusion properties of hepatitis C virus during cell entry. *Hepatology* **59**:776–788.

36. **Op De Beeck A, Montserret R, Duvet S, Cocquerel L, Cacan R, Barberot B, Le Maire M, Penin F, Dubuisson J.** 2000. The Transmembrane Domains of Hepatitis C Virus Envelope Glycoproteins E1 and E2 Play a Major Role in Heterodimerization. *J Biol Chem* **275**:31428–31437.
37. **Hopcraft SE, Evans MJ.** 2015. Selection of a hepatitis C virus with altered entry factor requirements reveals a genetic interaction between the E1 glycoprotein and claudins. *Hepatology* **62**:1059–1069.
38. **Zheng A, Yuan F, Li Y, Zhu F, Hou P, Li J, Song X, Ding M, Deng H.** 2007. Claudin-6 and Claudin-9 Function as Additional Coreceptors for Hepatitis C Virus. *J Virol* **81**:12465–12471.
39. **Meertens L, Bertaux C, Cukierman L, Cormier E, Lavillette D, Cosset FL, Dragic T.** 2008. The Tight Junction Proteins Claudin-1, -6, and -9 Are Entry Cofactors for Hepatitis C Virus. *J Virol* **82**:3555–3560.
40. **Fofana I, Zona L, Thumann C, Heydmann L, Durand SC, Lupberger J, Blum HE, Pessaux P, Gondeau C, Reynolds GM, McKeating JA, Grunert F, Thompson J, Zeisel MB, Baumert TF.** 2013. Functional Analysis of Claudin-6 and Claudin-9 as Entry Factors for Hepatitis C Virus Infection of Human Hepatocytes by Using Monoclonal Antibodies. *J Virol* **87**:10405–10410.
41. **Combet C, Garnier N, Charavay C, Grando D, Crisan D, Lopez J, Dehne-Garcia A, Geourjon C, Bettler E, Hulo C, Le Mercier P, Bartenschlager R, Diepolder H, Moradpour D, Pawlotsky JM, Rice CM, Trépo C, Penin F, Deléage G.** 2007. euHCVdb: the European hepatitis C virus database. *Nucleic Acids Res* **35**:D363–6.
42. **Kunkel M, Lorinczi M, Rijnbrand R, Lemon SM, Watowich SJ.** 2001. Self-

- assembly of nucleocapsid-like particles from recombinant hepatitis C virus core protein. *J Virol* **75**:2119–2129.
43. **Blanchard E, Brand D, Trassard S, Goudeau A, Roingeard P.** 2002. Hepatitis C virus-like particle morphogenesis. *J Virol* **76**:4073–4079.
44. **Nakai K, Okamoto T, Kimura-Someya T, Ishii K, Lim CK, Tani H, Matsuo E, Abe T, Mori Y, Suzuki T, Miyamura T, Nunberg JH, Moriishi K, Matsuura Y.** 2006. Oligomerization of Hepatitis C Virus Core Protein Is Crucial for Interaction with the Cytoplasmic Domain of E1 Envelope Protein. *J Virol* **80**:11265–11273.
45. **Nakabayashi H, Taketa K, Miyano K, Yamane T, Sato J.** 1982. Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res* **42**:3858–3863.
46. **Dubuisson J, Hsu HH, Cheung RC, Greenberg HB, Russell DG, Rice CM.** 1994. Formation and intracellular localization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia and Sindbis viruses. *J Virol* **68**:6147–6160.
47. **Flint M, Maidens C, Loomis-Price LD, Shotton C, Dubuisson J, Monk P, Higginbottom A, Levy S, McKeating JA.** 1999. Characterization of hepatitis C virus E2 glycoprotein interaction with a putative cellular receptor, CD81. *J Virol* **73**:6235–6244.
48. **Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, Wölk B, Tellinghuisen TL, Liu CC, Maruyama T, Hynes RO, Burton DR, McKeating JA, Rice CM.** 2005. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* **309**:623–626.

49. **Macdonald A, Crowder K, Street A, McCormick C, Saksela K, Harris M.** 2003. The Hepatitis C Virus Non-structural NS5A Protein Inhibits Activating Protein-1 Function by Perturbing Ras-ERK Pathway Signaling. *J Biol Chem* **278**:17775–17784.
50. **Maillard P, Krawczynski K, Nitkiewicz J, Bronnert C, Sidorkiewicz M, Gounon P, Dubuisson J, Faure G, Crainic R, Budkowska A.** 2001. Nonenveloped nucleocapsids of hepatitis C virus in the serum of infected patients. *J Virol* **75**:8240–8250.
51. **Catanese MT, Loureiro J, Jones CT, Dorner M, von Hahn T, Rice CM.** 2013. Different Requirements for Scavenger Receptor Class B Type I in Hepatitis C Virus Cell-Free versus Cell-to-Cell Transmission. *J Virol* **87**:8282–8293.
52. **Fofana I, Krieger SE, Grunert F, Glauben S, Xiao F, Kremer SF, Soulier E, Royer C, Thumann C, Mee CJ, McKeating JA, Dragic T, Pessaux P, Stoll-Keller F, Schuster C, Thompson J, Baumert TF.** 2010. Monoclonal Anti-Claudin 1 Antibodies Prevent Hepatitis C Virus Infection of Primary Human Hepatocytes. *Gastroenterology* **139**:953–964.e4.
53. **Biasini M, Bienert S, Waterhouse A, Arnold K, Studer G, Schmidt T, Kiefer F, Gallo Cassarino T, Bertoni M, Bordoli L, Schwede T.** 2014. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Res* **42**:W252–8.
54. **Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, Murthy K, Habermann A, Kräusslich H-G, Mizokami M, Bartenschlager R, Liang TJ.** 2005. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* **11**:791–796.

55. **Delgrange D, Pillez A, Castelain S, Cocquerel L, Rouille Y, Dubuisson J, Wakita T, Duverlie G, 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.
56. **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.
57. **Mederacke I, Wedemeyer H, Ciesek S, Steinmann E, Raupach R, Wursthorn K, Manns MP, Tillmann HL.** 2009. Performance and clinical utility of a novel fully automated quantitative HCV-core antigen assay. *J Clin Virol* **46**:210–215.
58. **Morota K, Fujinami R, Kinukawa H, Machida T, Ohno K, Saegusa H, Takeda K.** 2009. A new sensitive and automated chemiluminescent microparticle immunoassay for quantitative determination of hepatitis C virus core antigen. *J Virol Methods* **157**:8–14.
59. **Lavie M, Sarrazin S, Montserret R, Descamps V, Baumert TF, Duverlie G, Séron K, Penin F, Dubuisson J.** 2014. Identification of conserved residues in hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 that modulate virus dependence on CD81 and SR-B1 entry factors. *J Virol* **88**:10584–10597.
60. **Poenisch M, Metz P, Blankenburg H, Ruggieri A, Lee JY, Rupp D, Rebhan I, Diederich K, Kaderali L, Domingues FS, Albrecht M, Lohmann V, Erfle H, Bartenschlager R.** 2015. Identification of HNRNPK as Regulator of Hepatitis C Virus Particle Production. *PLoS Pathog* **11**:e1004573.

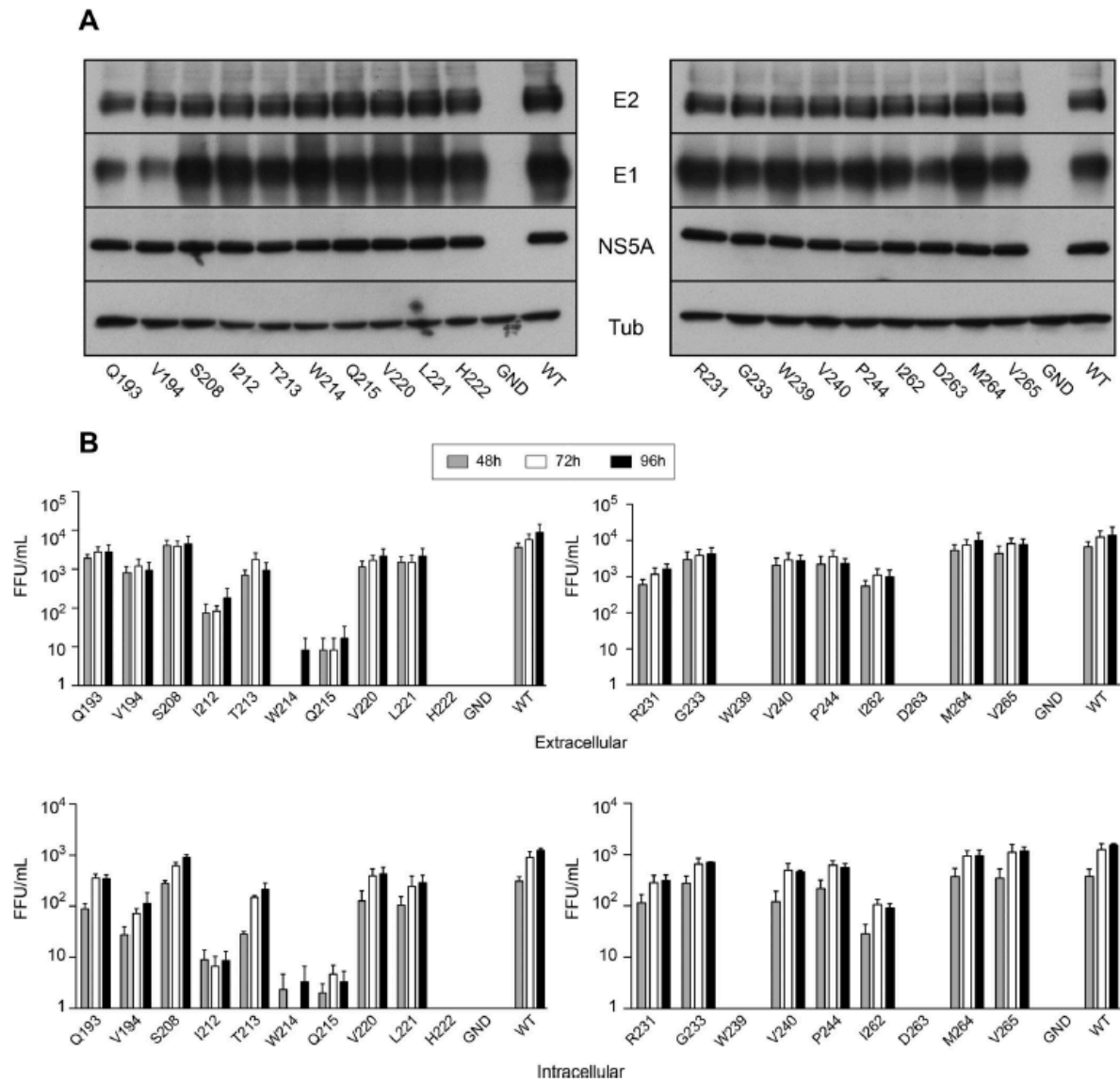


Fig. 2 : Effects of mutations on viral protein expression and infectivity. (A) Huh-7 cells were electroporated with viral RNA transcribed from JFH1-derived mutants, and they were lysed at 48 h postelectroporation. Viral proteins were separated by SDS-PAGE and detected by Western blotting with MAbs A4 (anti-E1), 3/11 (anti-E2), and anti-NS5A. Western blotting with an anti-beta-tubulin antibody was performed in parallel to verify that equal amounts of cell lysates had been loaded. (B) Infectivity of E1 mutants. Huh-7 cells were electroporated with viral RNA transcribed from JFH1-derived mutants. At 48, 72, and 96 h postelectroporation, infectivities of the supernatants and intracellular viruses were determined by titration. Error bars indicate standard errors of the means from at least three independent experiments. Results were compared to those for the wild type, and a P value of < 0.05 was determined for intracellular mutants Q193A, V194A, I212A, T213A, W214A, Q215A, V220A, L221A, H222A, R231A, G233A, W239A, V240A, P244A, I262A, D263A and M264A. A P value of < 0.05 was determined for extracellular mutants I212A, T213A, W214A, Q215A, H222A, W239A, and D263A. WT, wild type; FFU, focus-forming units.

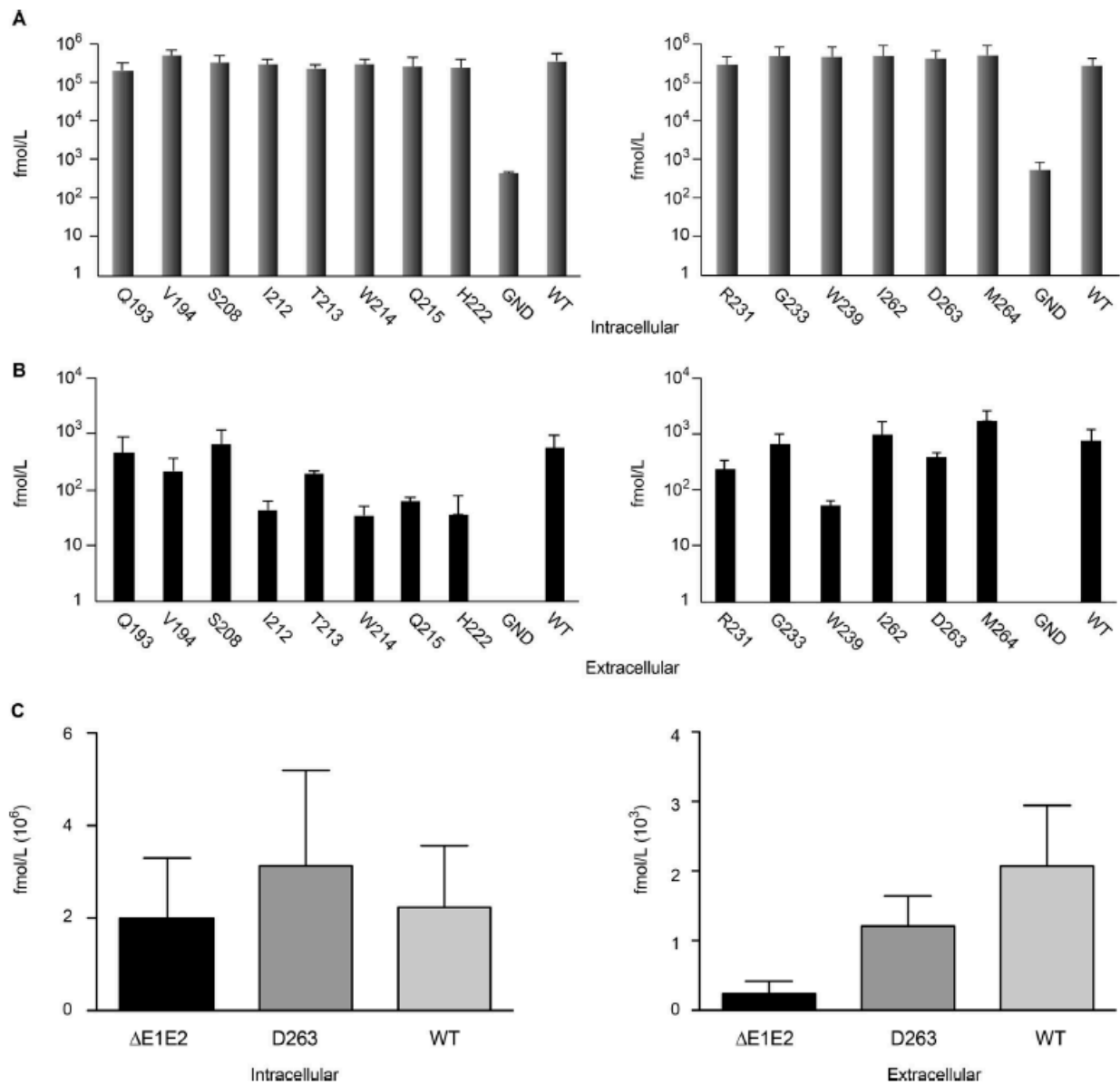


Fig. 3 : Analysis of core protein release for E1 mutants. Huh-7 cells were electroporated with viral RNA transcribed from JFH1-derived mutants. At 48 h postelectroporation, the amount of intracellular core antigen was determined in cell lysates (A) and supernatants (B). A control experiment with a genome defective in virus assembly, Δ E1E2, is shown in panel C. HCV core protein was quantified by a fully automated chemiluminescent microparticle immunoassay. Error bars indicate standard deviations. Results were compared to those for the wild type, and a P value of < 0.05 was determined for extracellular mutants I212A, T213A, W214A, Q215A, H222A, and W239A.

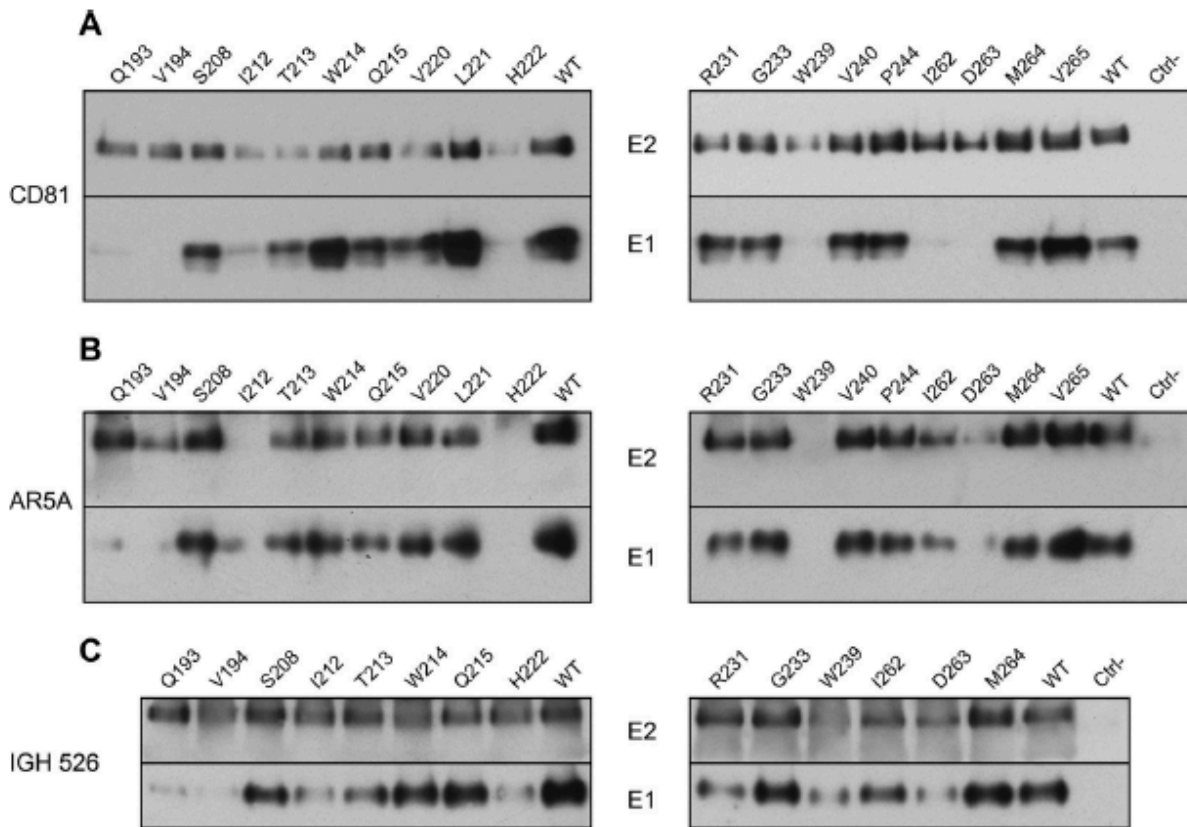


Fig. 4: Effect of E1 mutations on HCV glycoprotein folding and E1E2 heterodimerization. (A) Interaction of viral glycoproteins with HCV entry factor CD81. At 48 h postelectroporation, lysates were analyzed by GST pulldown using a CD81-LEL-GST fusion protein. Pulled-down E1 and E2 were analyzed by SDS-PAGE and detected by Western blotting with MAb A4 and 3/11. (B and C) Interaction of HCV glycoproteins with the conformation-sensitive anti-E1E2 MAbs AR5A and anti E1 MAbs IGH526, as indicated. At 48 h postelectroporation, E1 and E2 from cell lysates were analyzed by immunoprecipitation with MAb AR5A and IGH526. Precipitated E1 and E2 were then separated by SDS-PAGE and detected by Western blotting with MAb A4 and 3/11. The weaker E1 signals observed with two of our mutants (Q193A and V194A) are likely due to the involvement of these two residues in the A4 epitope.

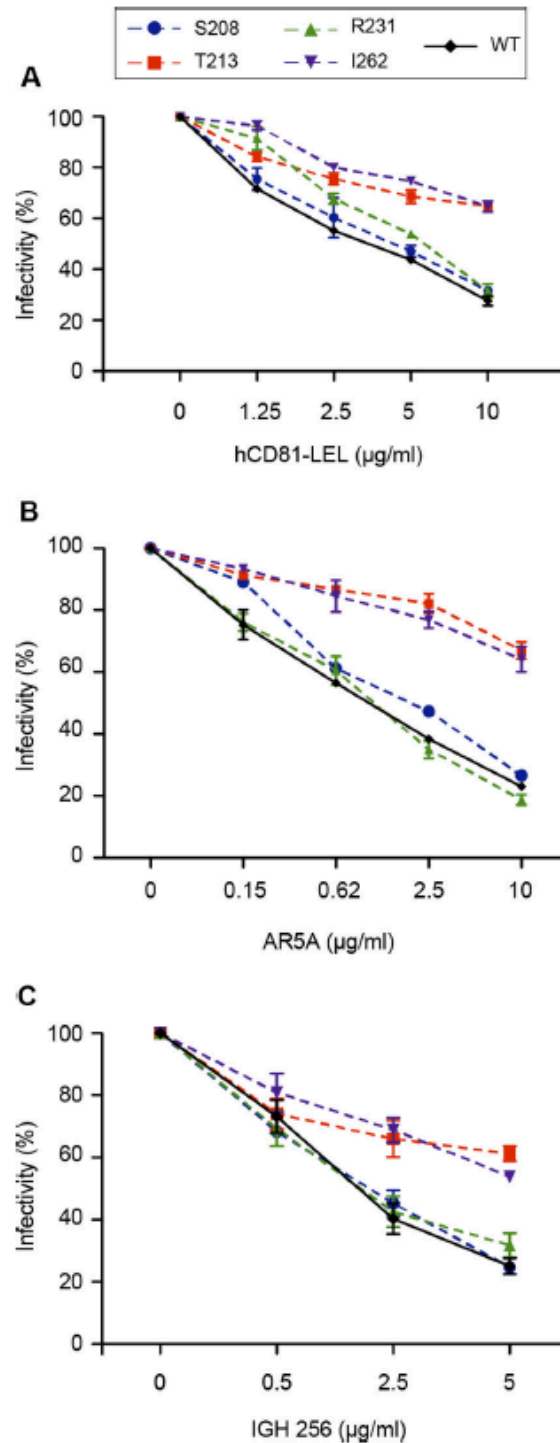


Fig. 5 : Effect of E1 mutations on sensitivity to antibody neutralization and inhibition by CD81. CD81 inhibition assays (A), AR5A neutralization experiments (B), and IGH526 neutralization experiments (C) were performed by incubating E1 mutants or wild-type virus with increasing concentrations of human CD81-LEL, MAb AR5A, or MAb IGH526. After 2 h of incubation at 37°C, the mixtures were put into contact with target cells, and the inoculum was replaced by fresh medium at 6 h postinfection. At 72 h postinfection, residual infectivity was measured by immunofluorescence. The values are the combined data from three independent experiments. The error bars represent standard errors of the means. Results were compared to those for the wild type, and a P value of < 0.05 was determined for mutants T213A and I262A under all inhibitory conditions.

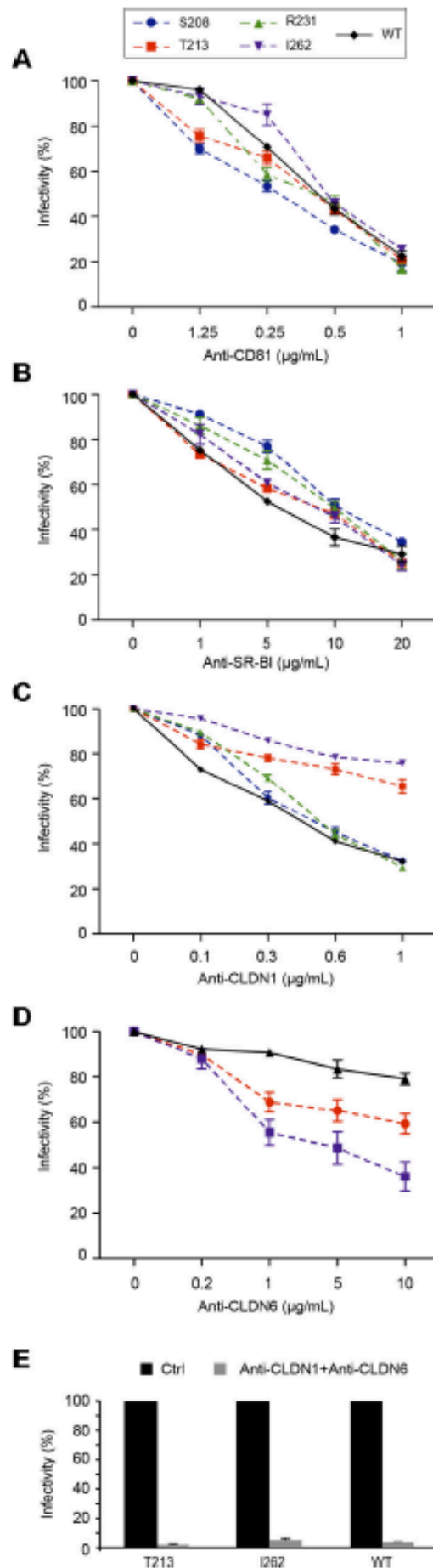


Fig. 6 : Effect of E1 mutations on the recognition of HCV receptors. (A to D) Huh-7 cells were preincubated for 2 h at 37°C with increasing concentrations of antibodies targeting HCV receptors: anti-CD81 Mab JS81, anti-SR-BI MAb Cla-I, anti-CLDN1 MAb OM8A9-A3, and anti-CLDN6 MAb 342927, as indicated. Cells were then incubated with E1 mutants or wild-type virus, and the inoculum was replaced by fresh medium at 6 h postinfection. At 72 h postinfection, cells were processed for immunofluorescence to quantify residual infectivity. The values are the combined data from three independent experiments. The error bars represent standard errors of the means. Results were compared to those for the wild type, and a P value of < 0.05 was determined for mutants T213A and I262A in the presence of anti-CLDN1 and anti-CLDN6 antibodies. (E) Effect of E1 mutations on the recognition of CLDN1 and CLDN6. Huh-7 cells were preincubated for 2 h at 37°C with a combination of anti-CLDN1 (5 µg/ml) and anti-CLDN6 (10 µg/ml) MAbs. Cells were then incubated with E1 mutants or wild-type virus, and the inoculum was replaced by fresh medium at 6 h postinfection. At 72 h postinfection, cells were processed for immunofluorescence to quantify the residual infectivity. The values are the combined data from three independent experiments. The error bars represent standard errors of the means.

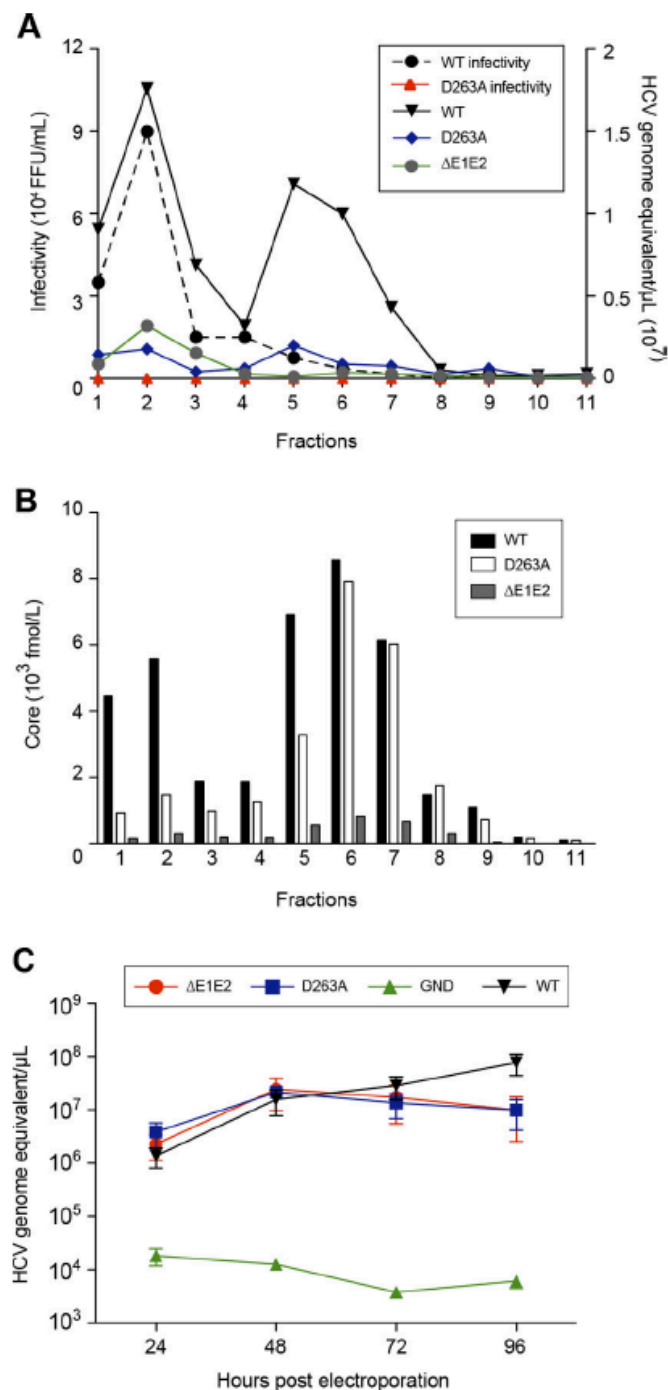


Fig. 7 : Characterization of the secreted form of the D263A mutant. Concentrated supernatant of cells electroporated with HCV was separated by sedimentation through a 10 to 50% iodixanol gradient. Fractions were collected from the top and analyzed for their infectivity as well as their viral RNA (A) and core protein content (B). (C) Analyses of intracellular genomic replication for the D263A mutant. Intracellular HCV genome copies in electroporated cells were quantified at different times postelectroporation. Control experiments with the wild type and Δ E1E2 and GND mutants were performed. The error bars represent standard deviations.

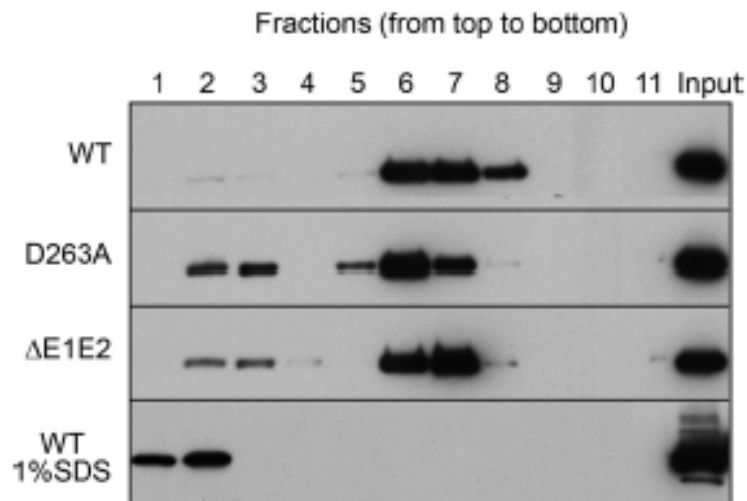


Fig. 8 : Analysis of core protein oligomerization by velocity sedimentation. Cells electroporated with the D263A mutant, Δ E1E2, or wild-type JFH1 RNA genome were lysed at 48 h postelectroporation. Lysates were subjected to velocity sedimentation on a 10 to 50% iodixanol density gradient, followed by Western blot analysis of core protein. Fractions were collected from the top. A control gradient was performed in parallel with extracts of cells electroporated with the wild-type genome that had been treated with 1% SDS. The input represents 8% of lysates.

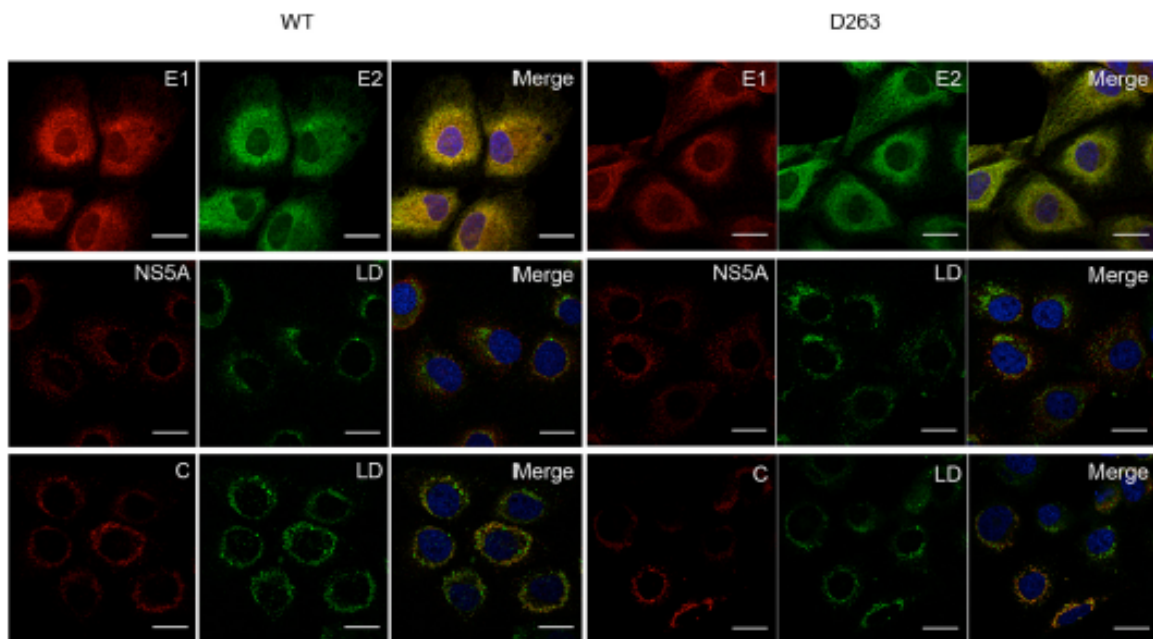


Fig. 9 : Subcellular localization of HCV proteins in the context of the D263A mutant. Electroporated cells grown on coverslips were fixed at 48 h postelectroporation and processed for immunofluorescence with antibodies against viral proteins (E1, E2, core protein [C], and NS5A). Lipid droplets were stained with BODIPY 493/503 (green). Rat anti-E2 Mab 3/11 was used for the colocalization with E1 (mouse anti-E1 MAb A4). Anti-core MAb ACAP-27 was used for the colocalization with lipid droplets (LD). The NS5A protein was labeled with anti-NS5A (9E10). Nuclei were stained with DAPI (blue). Representative confocal images of individual cells are shown with the merged images in the right column. Bar, 25 μ m.

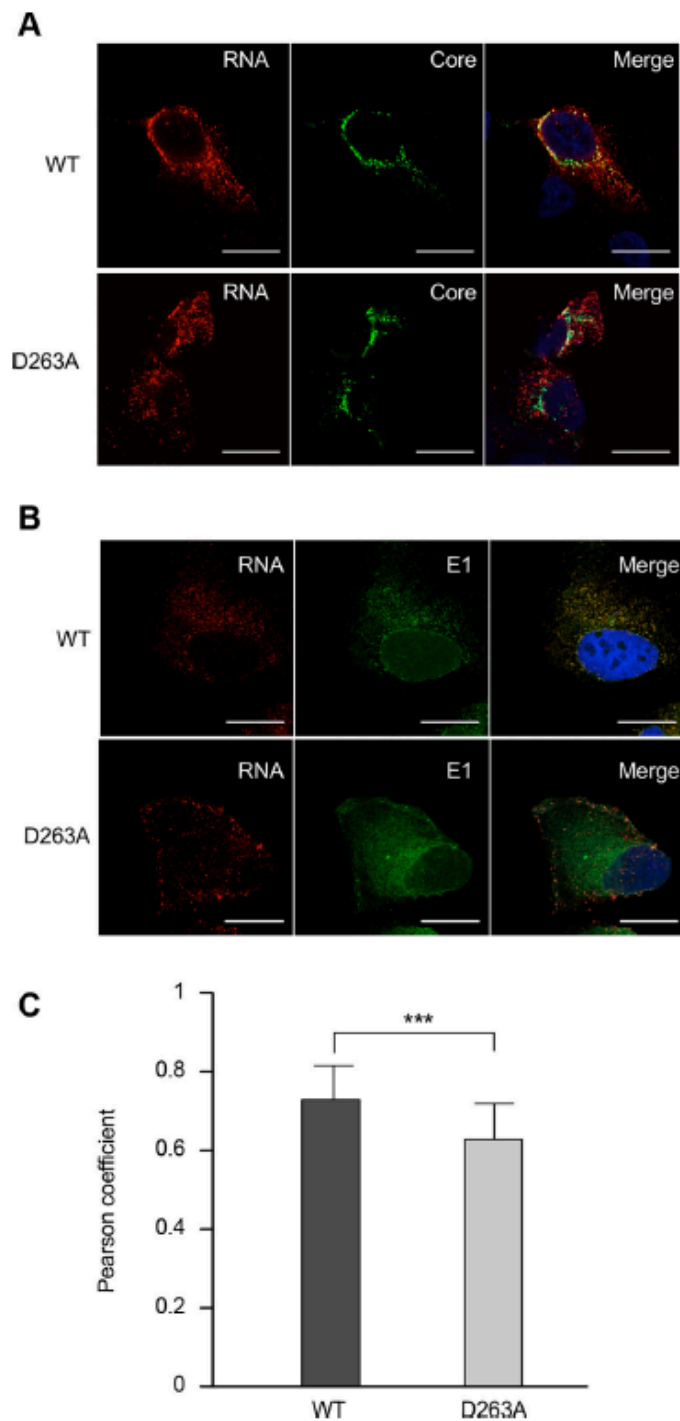


Fig. 10 : Subcellular localization of the D263A mutant and wild-type RNA by fluorescence in situ hybridization (FISH). Huh-7 cells were electroporated with the D263A and wild-type (WT) RNA genomes, fixed at 48 h postelectroporation, and processed for HCV positive-strand-specific RNA detection, followed by immunofluorescence staining for core protein with MAb ACAP-27 (A) or for E1 with MAb A4 (B). Scale bar, 20 μ m. (C) Pearson's correlation coefficient. Error bars represent standard deviations from 21 different images (***, $P < 0.0004$).

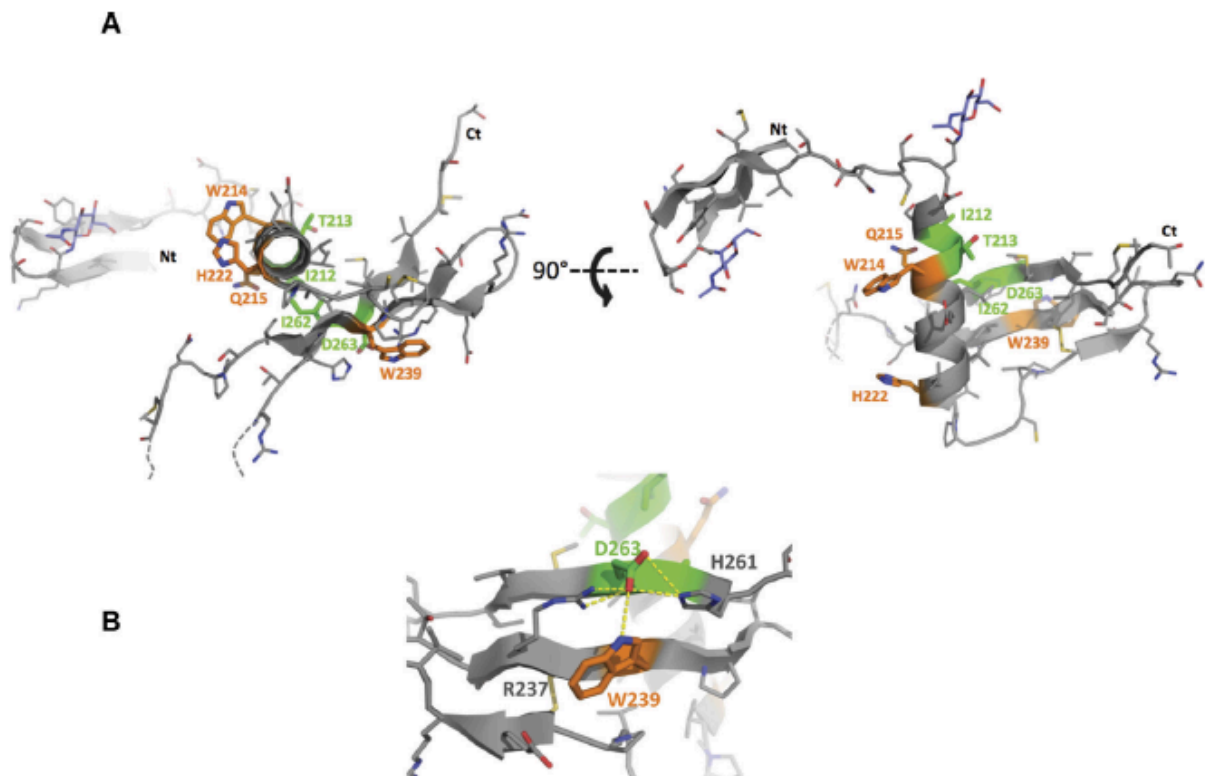


Fig. 11 : Positions of identified amino acid residues on the 3D structure of the E1 N-terminal region. The residues identified in this study are highlighted on the structural model of the N-terminal region of E1 from the JFH1 isolate. This model was built using the Swiss-Model web server (53) with the crystallographic structure of E1 (H77 strain) (PDB accession number 4UOI) as the template. (A) Residues for which the mutation toward an alanine showed an interesting or lethal phenotype are shown in green or orange, respectively, and their side chains are shown in stick rendering. (B) Hydrogen bond network established by the D263 residue with others residues from the $\beta 4$ and $\beta 5$ strands. The figure was generated using the PyMOL Molecular Graphics System, version 1.8 (Schr.dinger, LLC). Ct, C terminus; Nt, N terminus.

Bibliographie

A

- Abdel-Misih, S. R., & Bloomston, M. (2010). Liver anatomy. *Surgical Clinics of North America*, 90(4), 643-653.
- Acton, S. L., Scherer, P. E., Lodish, H. F., & Krieger, M. (1994). Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 269(33), 21003-21009.
- Agnello, V., Ábel, G., Elfahal, M., Knight, G. B., & Zhang, Q. X. (1999). Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(22), 12766-12771.
- Albecka, A., Belouzard, S., de Beeck, A. O., Descamps, V., Goueslain, L., Bertrand-Michel, J., ... & Dubuisson, J. (2012). Role of low-density lipoprotein receptor in the hepatitis C virus life cycle. *Hepatology*, 55(4), 998-1007.
- Albecka, A., Montserret, R., Krey, T., Tarr, A. W., Diesis, E., Ball, J. K., ... & Dubuisson, J. (2011). Identification of new functional regions in hepatitis C virus envelope glycoprotein E2. *Journal of virology*, 85(4), 1777-1792.
- Alric, L., Fort, M., Izopet, J., Vinel, J. P., Charlet, J. P., Selves, J., ... & Abbal, M. (1997). Genes of the major histocompatibility complex class II influence the outcome of hepatitis C virus infection. *Gastroenterology*, 113(5), 1675-1681.
- Amako, Y., Tsukiyama-Kohara, K., Katsume, A., Hirata, Y., Sekiguchi, S., Tobita, Y., ... & Kohara, M. (2010). Pathogenesis of hepatitis C virus infection in *Tupaia belangeri*. *Journal of virology*, 84(1), 303-311.
- Ananthakrishnan, A., Gogineni, V., & Saeian, K. (2006, March). Epidemiology of primary and secondary liver cancers. In *Seminars in interventional radiology* (Vol. 23, No. 01, pp. 047-063). Copyright© 2006 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New York, NY 10001, USA.
- Andersson, H., Barth, B. U., Ekström, M., & Garoff, H. (1997). Oligomerization-dependent folding of the membrane fusion protein of Semliki Forest virus. *Journal of virology*, 71(12), 9654-9663.
- Andre, P., Komurian-Pradel, F., Deforges, S., Perret, M., Berland, J. L., Sodoyer, M., ... & Lotteau, V. (2002). Characterization of low-and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles. *Journal of virology*, 76(14), 6919-6928.
- Andréo, U., Maillard, P., Kalinina, O., Walic, M., Meurs, E., Martinot, M., ... & Budkowska, A. (2007). Lipoprotein lipase mediates hepatitis C virus (HCV) cell entry and inhibits HCV infection. *Cellular microbiology*, 9(10), 2445-2456.
- 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(5), 3187-3194.
- Appel, N., Zayas, M., Miller, S., Krijnse-Locker, J., Schaller, T., Friebe, P., ... & Bartenschlager, R. (2008). Essential role of domain III of nonstructural protein 5A for hepatitis C virus infectious particle assembly. *PLoS Pathog*, 4(3), e1000035.
- Ariumi, Y., Kuroki, M., Maki, M., Ikeda, M., Dansako, H., Wakita, T., & Kato, N. (2011). The ESCRT system is required for hepatitis C virus production. *PloS one*, 6(1), e14517.

Arnaud, N., Dabo, S., Maillard, P., Budkowska, A., Kalliampakou, K. I., Mavromara, P., ... & Wakita, T. (2010). Hepatitis C virus controls interferon production through PKR activation. *PLoS one*, 5(5), e10575.

Atkins, E., Tatineni, R., Li, H., Gretch, D., Harris, M., & Griffin, S. (2014). The stability of secreted, acid-labile H77/JFH-1 hepatitis C virus (HCV) particles is altered by patient isolate genotype 1a p7 sequences. *Virology*, 448, 117-124.

B

Backovic, M., & Jardetzky, T. S. (2011). Class III viral membrane fusion proteins. In *Cell Fusion in Health and Disease* (pp. 91-101). Springer Netherlands.

Backovic, M., Longnecker, R., & Jardetzky, T. S. (2009). Structure of a trimeric variant of the Epstein–Barr virus glycoprotein B. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(8), 2880-2885.

Baldick, C. J., Wichroski, M. J., Pendri, A., Walsh, A. W., Fang, J., Mazzucco, C. E., ... & Zhai, W. (2010). A novel small molecule inhibitor of hepatitis C virus entry. *PLoS Pathog*, 6(9), e1001086.

Ball, J. K., Tarr, A. W., & McKeating, J. A. (2014). The past, present and future of neutralizing antibodies for hepatitis C virus. *Antiviral research*, 105, 100-111.

Bankwitz, D., Doepke, M., Hueging, K., Weller, R., Bruening, J., Behrendt, P., ... & Pietschmann, T. (2017). Maturation of secreted HCV particles by incorporation of secreted apoE protects from antibodies by enhancing infectivity. *Journal of Hepatology*.

Bankwitz, D., Steinmann, E., Bitzegeio, J., Ciesek, S., Friesland, M., Herrmann, E., ... & Pécheur, E. I. (2010). Hepatitis C virus hypervariable region 1 modulates receptor interactions, conceals the CD81 binding site, and protects conserved neutralizing epitopes. *Journal of virology*, 84(11), 5751-5763.

Bankwitz, D., Vieyres, G., Hueging, K., Bitzegeio, J., Doepke, M., Chhatwal, P., ... & Baumert, T. F. (2014). Role of hypervariable region 1 for the interplay of hepatitis C virus with entry factors and lipoproteins. *Journal of virology*, 88(21), 12644-12655.

Baquero, E., Albertini, A. A., Vachette, P., Lepault, J., Bressanelli, S., & Gaudin, Y. (2013). Intermediate conformations during viral fusion glycoprotein structural transition. *Current opinion in virology*, 3(2), 143-150.

Barba, G., Harper, F., Harada, T., Kohara, M., Goulinet, S., Matsuura, Y., ... & Brechot, C. (1997). Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(4), 1200-1205.

Bartenschlager, R. (2002). Hepatitis C virus replicons: potential role for drug development. *Nature reviews. Drug discovery*, 1(11), 911.

Bartenschlager, R., & Lohmann, V. (2000). Replication of hepatitis C virus. *Journal of General Virology*, 81(7), 1631-1648.

Bartenschlager, R., Lohmann, V., & Penin, F. (2013). The molecular and structural basis of advanced antiviral therapy for hepatitis C virus infection. *Nature Reviews Microbiology*, 11(7), 482-496.

- 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(12), 7519-7528.
- Bartenschlager, R., Penin, F., Lohmann, V., & André, P. (2011). Assembly of infectious hepatitis C virus particles. *Trends in microbiology*, 19(2), 95-103.
- Barth, H., Schäfer, C., Adah, M. I., Zhang, F., Linhardt, R. J., Toyoda, H., ... & von Weizsäcker, F. (2003). Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate. *Journal of Biological Chemistry*, 278(42), 41003-41012.
- Barth, H., Schnober, E. K., Zhang, F., Linhardt, R. J., Depla, E., Boson, B., ... & Baumert, T. F. (2006). Viral and cellular determinants of the hepatitis C virus envelope-heparan sulfate interaction. *Journal of virology*, 80(21), 10579-10590.
- Bartosch, B., Bukh, J., Meunier, J. C., Granier, C., Engle, R. E., Blackwelder, W. C., ... & Purcell, R. H. (2003a). In vitro assay for neutralizing antibody to hepatitis C virus: evidence for broadly conserved neutralization epitopes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(24), 14199-14204.
- Bartosch, B., Dubuisson, J., & Cosset, F. L. (2003c). Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *Journal of Experimental Medicine*, 197(5), 633-642.
- Bartosch, B., Verney, G., Dreux, M., Donot, P., Morice, Y., Penin, F., ... & 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(13), 8217-8229.
- Bartosch, B., Vitelli, A., Granier, C., Goujon, C., Dubuisson, J., Pascale, S., ... & 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. *Journal of Biological Chemistry*, 278(43), 41624-41630.
- 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(8), 3933-3941.
- Bayer, M. E., Blumberg, B. S., & Werner, B. (1968). Particles associated with Australia antigen in the sera of patients with leukaemia, Down's Syndrome and hepatitis. *Nature*, 218(5146), 1057-1059.
- Benedicto, I., Molina-Jiménez, F., Bartosch, B., Cosset, F. L., Lavillette, D., Prieto, J., ... & Majano, P. L. (2009). The tight junction-associated protein occludin is required for a postbinding step in hepatitis C virus entry and infection. *Journal of virology*, 83(16), 8012-8020.
- Benga, W. J., Krieger, S. E., Dimitrova, M., Zeisel, M. B., Parnot, M., Lupberger, J., ... & Schuster, C. (2010). Apolipoprotein E interacts with hepatitis C virus nonstructural protein 5A and determines assembly of infectious particles. *Hepatology*, 51(1), 43-53.
- Berger, K. L., & Randall, G. (2009). Potential roles for cellular cofactors in hepatitis C virus replication complex formation. *Communicative & integrative biology*, 2(6), 471-473.
- Berger, K. L., Kelly, S. M., Jordan, T. X., Tartell, M. A., & Randall, G. (2011). Hepatitis C virus stimulates the phosphatidylinositol 4-kinase III alpha-dependent phosphatidylinositol 4-phosphate production that is essential for its replication. *Journal of virology*, 85(17), 8870-8883.

- Bihl, F., & Negro, F. (2009). Chronic hepatitis E in the immunosuppressed: a new source of trouble?. *Journal of hepatology*, 50(2), 435-437.
- Bismuth, H. (2013). Revisiting liver anatomy and terminology of hepatectomies. *Annals of surgery*, 257(3), 383-386.
- Bissig, K. D., Le, T. T., Woods, N. B., & Verma, I. M. (2007). Repopulation of adult and neonatal mice with human hepatocytes: a chimeric animal model. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(51), 20507-20511.
- 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. *The Journal of clinical investigation*, 120(3), 924-930.
- Blanchard, E., Belouzard, S., Goueslain, L., Wakita, T., Dubuisson, J., Wychowski, C., & Rouillé, Y. (2006). Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *Journal of virology*, 80(14), 6964-6972.
- Blanchard, E., Brand, D., Trassard, S., Goudeau, A., & Roingeard, P. (2002). Hepatitis C virus-like particle morphogenesis. *Journal of virology*, 76(8), 4073-4079.
- Blight, K. J., Kolykhalov, A. A., & Rice, C. M. (2000). Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science*, 290(5498), 1972-1974.
- Blight, K. J., McKeating, J. A., & Rice, C. M. (2002). Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication. *Journal of virology*, 76(24), 13001-13014.
- Blight, K. J., McKeating, J. A., Marcotrigiano, J., & Rice, C. M. (2003). Efficient replication of hepatitis C virus genotype 1a RNAs in cell culture. *Journal of virology*, 77(5), 3181-3190.
- Bochud, P. Y., Cai, T., Overbeck, K., Bochud, M., Dufour, J. F., Müllhaupt, B., ... & Malinverni, R. (2009). Genotype 3 is associated with accelerated fibrosis progression in chronic hepatitis C. *Journal of hepatology*, 51(4), 655-666.
- Bonkovsky, H. L., Troy, N., McNeal, K., Banner, B. F., Sharma, A., Obando, J., ... & Hsieh, C. C. (2002). Iron and HFE or TfR1 mutations as comorbid factors for development and progression of chronic hepatitis C. *Journal of hepatology*, 37(6), 848-854.
- Boo, I., 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. *Biochemical Journal*, 443(1), 85-94.
- 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. *Journal of Biological Chemistry*, 278(46), 45785-45792.
- Boulant, S., Douglas, M. W., Moody, L., Budkowska, A., Targett-Adams, P., & McLauchlan, J. (2008). Hepatitis C virus Core protein induces lipid droplet redistribution in a microtubule-and dynein-dependent manner. *Traffic*, 9(8), 1268-1282.
- Boulant, S., Targett-Adams, P., & McLauchlan, J. (2007). Disrupting the association of hepatitis C virus core protein with lipid droplets correlates with a loss in production of infectious virus. *Journal of General Virology*, 88(8), 2204-2213.

- Bowen, D. G., & Walker, C. M. (2005). Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection. *Nature*, *436*(7053), 946-952.
- Branch, A. D., Stump, D. D., Gutierrez, J. A., Eng, F., & Walewski, J. L. (2005, February). 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. In *Seminars in liver disease* (Vol. 25, No. 01, pp. 105-117). Copyright© 2005 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New York, NY 10001, USA.
- 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*(17), 8316-8329.
- Brimacombe, C. L., Grove, J., Meredith, L. W., Hu, K., Syder, A. J., Flores, M. V., ... & Wong-Staal, F. (2011). Neutralizing antibody-resistant hepatitis C virus cell-to-cell transmission. *Journal of virology*, *85*(1), 596-605.
- Brown, M. S., & Goldstein, J. L. (1986). A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*, *232*(4746), 34-47.
- Brown, R. S. (2005). Hepatitis C and liver transplantation. *Nature*, *436*(7053), 973-978.
- Bruggmann, P., Berg, T., Ovrehus, A. L. H., Moreno, C., Brandao Mello, C. E., Roudot-Thoraval, F., ... & Hindman, S. J. (2014). Historical epidemiology of hepatitis C virus (HCV) in selected countries. *Journal of viral hepatitis*, *21*(s1), 5-33.
- Bukh, J. (2016). The history of hepatitis C virus (HCV): Basic research reveals unique features in phylogeny, evolution and the viral life cycle with new perspectives for epidemic control. *Journal of Hepatology*, *65*(1), S2-S21.
- Bukh, J., & Purcell, R. H. (2006). A milestone for hepatitis C virus research: A virus generated in cell culture is fully viable *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(10), 3500-3501.
- Bukh, J., Meuleman, P., Tellier, R., Engle, R. E., Feinstone, S. M., Eder, G., ... & Leroux-Roels, G. (2010). Challenge pools of hepatitis C virus genotypes 1–6 prototype strains: replication fitness and pathogenicity in chimpanzees and human liver-chimeric mouse models. *Journal of Infectious Diseases*, *201*(9), 1381-1389.
- Bukh, J., Pietschmann, T., Lohmann, V., Krieger, N., Faulk, K., Engle, R. E., ... & Bartenschlager, R. (2002). Mutations that permit efficient replication of hepatitis C virus RNA in Huh-7 cells prevent productive replication in chimpanzees. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99*(22), 14416-14421.

C

- Calattini, S., Fusil, F., Mancip, J., Thi, V. L. D., Granier, C., Gadot, N., ... & Dreux, M. (2015). Functional and biochemical characterization of hepatitis C virus (HCV) particles produced in a humanized liver mouse model. *Journal of Biological Chemistry*, *290*(38), 23173-23187.
- Calvo, D., & Vega, M. A. (1993). Identification, primary structure, and distribution of CLA-1, a novel member of the CD36/LIMPII gene family. *Journal of Biological Chemistry*, *268*(25), 18929-18935.

- Carlsen, T. H., Scheel, T. K., Ramirez, S., Fong, S. K., & Bukh, J. (2013). Characterization of hepatitis C virus recombinants with chimeric E1/E2 envelope proteins and identification of single amino acids in the E2 stem region important for entry. *Journal of virology*, *87*(3), 1385-1399.
- 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*(8), 3720-3730.
- Catanese, M. T., & Dorner, M. (2015). Advances in experimental systems to study hepatitis C virus in vitro and in vivo. *Virology*, *479*, 221-233.
- Catanese, M. T., Uryu, K., Kopp, M., Edwards, T. J., Andrus, L., Rice, W. J., ... & Rice, C. M. (2013). Ultrastructural analysis of hepatitis C virus particles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(23), 9505-9510.
- 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*(24), 13783-13793.
- Chen, J., Zhao, Y., Zhang, C., Chen, H., Feng, J., Chi, X., ... & Chen, H. (2014). Persistent hepatitis C virus infections and hepatopathological manifestations in immune-competent humanized mice. *Cell research*, *24*(9), 1050-1066.
- Chen, Y., Maguire, T., Hileman, R. E., Fromm, J. R., Esko, J. D., Linhardt, R. J., & Marks, R. M. (1997). Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nature medicine*, *3*(8), 866-871.
- Chen, Z., Benureau, Y., Rijnbrand, R., Yi, J., Wang, T., Warter, L., ... & Li, K. (2007). GB virus B disrupts RIG-I signaling by NS3/4A-mediated cleavage of the adaptor protein MAVS. *Journal of virology*, *81*(2), 964-976.
- Chernomordik, L. V., & Kozlov, M. M. (2003). Protein-lipid interplay in fusion and fission of biological membranes. *Annual review of biochemistry*, *72*(1), 175-207.
- Chernomordik, L. V., & Kozlov, M. M. (2008). Mechanics of membrane fusion. *Nature structural & molecular biology*, *15*(7), 675-683.
- Chevaliez, S., & Pawlotsky, J. M. (2007). Hepatitis C virus: virology, diagnosis and management of antiviral therapy. *World journal of gastroenterology*, *13*(17), 2461.
- Chevaliez, S., & Pawlotsky, J. M. (2009). How to use virological tools for optimal management of chronic hepatitis C. *Liver International*, *29*(s1), 9-14.
- Chevaliez, S., & Pawlotsky, J. M. (2012). Virology of hepatitis C virus infection. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, *26*(4), 381-389.
- Chevaliez, S., Bouvier-Alias, M., Brillet, R., & Pawlotsky, J. M. (2009). Hepatitis C virus (HCV) genotype 1 subtype identification in new HCV drug development and future clinical practice. *PLOS one*, *4*(12), e8209.
- Chevaliez, S., Soulier, A., Poiteau, L., Bouvier-Alias, M., & Pawlotsky, J. M. (2014). Clinical utility of hepatitis C virus core antigen quantification in patients with chronic hepatitis C. *Journal of Clinical Virology*, *61*(1), 145-148.

- Chmielewska, A. M., Naddeo, M., Capone, S., Ammendola, V., Hu, K., Meredith, L., ... & Colloca, S. (2014). Combined adenovirus vector and hepatitis C virus envelope protein prime-boost regimen elicits T cell and neutralizing antibody immune responses. *Journal of virology*, 88(10), 5502-5510.
- Choo, Q. L., Kuo, G., Ralston, R., Weiner, A., Chien, D., Van Nest, G., ... & Kuo, C. (1994). Vaccination of chimpanzees against infection by the hepatitis C virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(4), 1294-1298.
- Choo, Q. L., Kuo, G., Weiner, A. J., Overby, L. R., Bradley, D. W., & Houghton, M. (1989). Isolation of a cDNA Clone Derived from a Blood-Borne Non-A, Non-B Viral Hepatitis Genome. *Science*, 244(4902), 359.
- Choo, Q. L., Richman, K. H., Han, J. H., Berger, K., Lee, C., Dong, C., ... & Barr, P. J. (1991). Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(6), 2451-2455.
- Clark, V. C., Peter, J. A., & Nelson, D. R. (2013). New therapeutic strategies in HCV: second-generation protease inhibitors. *Liver International*, 33(s1), 80-84.
- Clément, S., Peyrou, M., Sanchez-Pareja, A., Bourgoin, L., Ramadori, P., Suter, D., ... & Negro, F. (2011). Down-regulation of phosphatase and tensin homolog by hepatitis C virus core 3a in hepatocytes triggers the formation of large lipid droplets. *Hepatology*, 54(1), 38-49.
- Clementi, N., Mancini, N., Solfrosi, L., Castelli, M., Clementi, M., & Burioni, R. (2012). Phage display-based strategies for cloning and optimization of monoclonal antibodies directed against human pathogens. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(7), 8273-8292.
- Cocquerel, L., Quinn, E. R., Flint, M., Hadlock, K. G., Fong, S. K., & Levy, S. (2003). Recognition of native hepatitis C virus E1E2 heterodimers by a human monoclonal antibody. *Journal of virology*, 77(2), 1604-1609.
- 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(8), 3623-3633.
- Codran, A., Royer, C., Jaeck, D., Bastien-Valle, M., Baumert, T. F., Kieny, M. P., ... & Martin, J. P. (2006). Entry of hepatitis C virus pseudotypes into primary human hepatocytes by clathrin-dependent endocytosis. *Journal of General Virology*, 87(9), 2583-2593.
- 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 Pathog*, 5(12), e1000702.
- Coller, K. E., Heaton, N. S., Berger, K. L., Cooper, J. D., Saunders, J. L., & Randall, G. (2012). Molecular determinants and dynamics of hepatitis C virus secretion. *PLoS Pathog*, 8(1), e1002466.
- Colpitts, C. C., Schang, L. M., Rachmawati, H., Frentzen, A., Pfaender, S., Behrendt, P., ... & Meuleman, P. (2013). Turmeric curcumin inhibits entry of all hepatitis C virus genotypes into human liver cells. *Gut*, gutjnl-2012.
- Cooper, S., Erickson, A. L., Adams, E. J., Kansopon, J., Weiner, A. J., Chien, D. Y., ... & Walker, C. M. (1999). Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus. *Immunity*, 10(4), 439-449.

Corless, L., Crump, C. M., Griffin, S. D., & Harris, M. (2010). Vps4 and the ESCRT-III complex are required for the release of infectious hepatitis C virus particles. *Journal of General Virology*, 91(2), 362-372.

Cormier, E. G., Durso, R. J., Tsamis, F., Boussebart, L., Manix, C., Olson, W. C., ... & Dragic, T. (2004a). L-SIGN (CD209L) and DC-SIGN (CD209) mediate transinfection of liver cells by hepatitis C virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(39), 14067-14072.

Cormier, E. G., Tsamis, F., Kajumo, F., Durso, R. J., Gardner, J. P., & Dragic, T. (2004b). CD81 is an entry coreceptor for hepatitis C virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(19), 7270-7274.

Cox, A. L., Netski, D. M., Mosbrugger, T., Sherman, S. G., Strathdee, S., Ompad, D., ... & Thomas, D. L. (2005). Prospective evaluation of community-acquired acute-phase hepatitis C virus infection. *Clinical Infectious Diseases*, 40(7), 951-958.

Cribier, B., Schmitt, C., Kirn, A., & Stoll-Keller, F. (1998). Inhibition of hepatitis C virus adsorption to peripheral blood mononuclear cells by dextran sulfate. *Archives of virology*, 143(2), 375-379.

Crotta, S., Stilla, A., Wack, A., D'Andrea, A., Nuti, S., D'Oro, U., ... & Abrignani, S. (2002). Inhibition of natural killer cells through engagement of CD81 by the major hepatitis C virus envelope protein. *Journal of Experimental Medicine*, 195(1), 35-42.

Cun, W., Jiang, J., & Luo, G. (2010). The C-terminal α -helix domain of apolipoprotein E is required for interaction with nonstructural protein 5A and assembly of hepatitis C virus. *Journal of virology*, 84(21), 11532-11541.

D

Da Costa, D., Turek, M., Felmlee, D. J., Girardi, E., Pfeffer, S., Long, G., ... & Baumert, T. F. (2012). Reconstitution of the entire hepatitis C virus life cycle in non-hepatic cells. *Journal of virology*, JVI-01066.

Dahari, H., Feinstone, S. M., & Major, M. E. (2010). Meta-analysis of hepatitis C virus vaccine efficacy in chimpanzees indicates an importance for structural proteins. *Gastroenterology*, 139(3), 965-974.

Danieli, T., Pelletier, S. L., Henis, Y. I., & White, J. M. (1996). Membrane fusion mediated by the influenza virus hemagglutinin requires the concerted action of at least three hemagglutinin trimers. *Journal of Cell Biology*, 133(3), 559-570.

De Beeck, A. O., Montserret, R., Duvet, S., Cocquerel, L., Cacan, R., Barberot, B., ... & Dubuisson, J. (2000). The transmembrane domains of hepatitis C virus envelope glycoproteins E1 and E2 play a major role in heterodimerization. *Journal of Biological Chemistry*, 275(40), 31428-31437.

De Beeck, A. O., Voisset, C., Bartosch, B., Ciczora, Y., Cocquerel, L., Keck, Z., ... & Dubuisson, J. (2004). Characterization of functional hepatitis C virus envelope glycoproteins. *Journal of virology*, 78(6), 2994-3002.

De Jong, Y. P., Dorner, M., Mommersteeg, M. C., Xiao, J. W., Balazs, A. B., Robbins, J. B., ... & Donovan, B. M. (2014). Broadly neutralizing antibodies abrogate established hepatitis C virus infection. *Science translational medicine*, 6(254), 254ra129-254ra129.

- De Vos, R., Verslype, C., Depla, E., Fevery, J., Van Damme, B., Desmet, V., & Roskams, T. (2002). Ultrastructural visualization of hepatitis C virus components in human and primate liver biopsies. *Journal of hepatology*, 37(3), 370-379.
- Deleersnyder, V., Pillez, A., Wychowski, C., Blight, K., Xu, J., Hahn, Y. S., ... & Dubuisson, J. (1997). Formation of native hepatitis C virus glycoprotein complexes. *Journal of virology*, 71(1), 697-704.
- Delgrange, D., Pillez, A., Castelain, S., Cocquerel, L., Rouille, Y., Dubuisson, J., ... & 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(9), 2495-2503.
- Deng, L., Ma, L., Virata-Theimer, M. L., Zhong, L., Yan, H., Zhao, Z., ... & Zhang, P. (2014). Discrete conformations of epitope II on the hepatitis C virus E2 protein for antibody-mediated neutralization and nonneutralization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(29), 10690-10695.
- Deng, L., Zhong, L., Struble, E., Duan, H., Ma, L., Harman, C., ... & Alter, H. (2013). Structural evidence for a bifurcated mode of action in the antibody-mediated neutralization of hepatitis C virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(18), 7418-7422.
- Deutsch, M., & Papatheodoridis, G. V. (2010). Danoprevir, a small-molecule NS3/4A protease inhibitor for the potential oral treatment of HCV infection. *Current opinion in investigational drugs (London, England: 2000)*, 11(8), 951-963.
- Diamond, D. L., Syder, A. J., Jacobs, J. M., Sorensen, C. M., Walters, K. A., Proll, S. C., ... & Metz, T. O. (2010). Temporal proteome and lipidome profiles reveal hepatitis C virus-associated reprogramming of hepatocellular metabolism and bioenergetics. *PLoS Pathog*, 6(1), e1000719.
- Diebold, S. S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S., & e Sousa, C. R. (2004). Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science*, 303(5663), 1529-1531.
- Diepolder, H. M., Gerlach, J. T., Zachoval, R., Hoffmann, R. M., Jung, M. C., Wierenga, E. A., ... & Sette, A. (1997). Immunodominant CD4+ T-cell epitope within nonstructural protein 3 in acute hepatitis C virus infection. *Journal of virology*, 71(8), 6011-6019.
- Doerrbecker, J., Meuleman, P., Kang, J., Riebesehl, N., Wilhelm, C., Friesland, M., ... & Steinmann, E. (2013). Thermostability of seven hepatitis C virus genotypes in vitro and in vivo. *Journal of viral hepatitis*, 20(7), 478-485.
- Dorner, M., Horwitz, J. A., Donovan, B. M., Labitt, R. N., Budell, W. C., Friling, T., ... & Akira, S. (2013). Completion of the entire hepatitis C virus life cycle in genetically humanized mice. *Nature*, 501(7466), 237-241.
- Dorner, M., Horwitz, J. A., Robbins, J. B., Barry, W. T., Feng, Q., Mu, K., ... & Law, M. (2011). A genetically humanized mouse model for hepatitis C virus infection. *Nature*, 474(7350), 208-211.
- Douam, F., Dao Thi, V. L., Maurin, G., Fresquet, J., Mompelat, D., Zeisel, M. B., ... & Lavillette, D. (2014). Critical interaction between E1 and E2 glycoproteins determines binding and fusion properties of hepatitis C virus during cell entry. *Hepatology*, 59(3), 776-788.
- Dowd, K. A., Netski, D. M., Wang, X. H., Cox, A. L., & Ray, S. C. (2009). Selection pressure from neutralizing antibodies drives sequence evolution during acute infection with hepatitis C virus. *Gastroenterology*, 136(7), 2377-2386.

- Dreux, M., Boson, B., Ricard-Blum, S., Molle, J., Lavillette, D., Bartosch, B., ... & Cosset, F. L. (2007). The exchangeable apolipoprotein ApoC-I promotes membrane fusion of hepatitis C virus. *Journal of Biological Chemistry*, 282(44), 32357-32369.
- Dreux, M., Garaigorta, U., Boyd, B., Décembre, E., Chung, J., Whitten-Bauer, C., ... & Chisari, F. V. (2012). Short-range exosomal transfer of viral RNA from infected cells to plasmacytoid dendritic cells triggers innate immunity. *Cell host & microbe*, 12(4), 558-570.
- Dreux, M., Pietschmann, T., Granier, C., Voisset, C., Ricard-Blum, S., Mangeot, P. E., ... & Bartenschlager, R. (2006). High density lipoprotein inhibits hepatitis C virus-neutralizing antibodies by stimulating cell entry via activation of the scavenger receptor BI. *Journal of Biological Chemistry*, 281(27), 18285-18295.
- Drummer, H. E., & Pountourios, P. (2004). Hepatitis C virus glycoprotein E2 contains a membrane-proximal heptad repeat sequence that is essential for E1E2 glycoprotein heterodimerization and viral entry. *Journal of Biological Chemistry*, 279(29), 30066-30072.
- Drummer, H. E., Boo, I., & Pountourios, 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(4), 1144-1148.
- Drummer, H. E., Maerz, A., & Pountourios, P. (2003). Cell surface expression of functional hepatitis C virus E1 and E2 glycoproteins. *FEBS letters*, 546(2-3), 385-390.
- Drummer, H. E., Wilson, K. A., & Pountourios, P. (2005). Determinants of CD81 dimerization and interaction with hepatitis C virus glycoprotein E2. *Biochemical and biophysical research communications*, 328(1), 251-257.
- Dubuisson, J., & Rice, C. M. (1996). Hepatitis C virus glycoprotein folding: disulfide bond formation and association with calnexin. *Journal of virology*, 70(2), 778-786.
- 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(10), 6147-6160.
- Dunlop, J., Owsianka, A., Cowton, V., & Patel, A. (2015). Current and future prophylactic vaccines for hepatitis C virus. *Vaccine: Development and Therapy*, 2015(5), 31-44.
- Duvet, S., Op De Beeck, A., Cocquerel, L., Wychowski, C., Cacan, R., & Dubuisson, J. (2002). Glycosylation of the hepatitis C virus envelope protein E1 occurs posttranslationally in a mannosylphosphoryldolichol-deficient CHO mutant cell line. *Glycobiology*, 12(2), 95-101.

E

- 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(12), 5974-5984.
- Einav, S., Gerber, D., Bryson, P. D., Sklan, E. H., Elazar, M., Maerkl, S. J., ... & Quake, S. R. (2008). Discovery of a hepatitis C target and its pharmacological inhibitors by microfluidic affinity analysis. *Nature biotechnology*, 26(9), 1019-1027.

El Omari, K., Iourin, O., Harlos, K., Grimes, J. M., & Stuart, D. I. (2013). Structure of a pestivirus envelope glycoprotein E2 clarifies its role in cell entry. *Cell reports*, 3(1), 30-35.

El Omari, K., Iourin, O., Kadlec, J., Sutton, G., Harlos, K., Grimes, J. M., & Stuart, D. I. (2014). Unexpected structure for the N-terminal domain of hepatitis C virus envelope glycoprotein E1. *Nature communications*, 5.

Evans, M. J., Rice, C. M., & Goff, S. P. (2004). Phosphorylation of hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates its protein interactions and viral RNA replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(35), 13038-13043.

Evans, M. J., von Hahn, T., Tscherne, D. M., Syder, A. J., Panis, M., Wölk, B., ... & Rice, C. M. (2007). Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature*, 446(7137), 801-805.

Eyre, N. S., Fiches, G. N., Aloia, A. L., Helbig, K. J., McCartney, E. M., McErlean, C. S., ... & Beard, M. R. (2014). Dynamic imaging of the hepatitis C virus NS5A protein during a productive infection. *Journal of virology*, 88(7), 3636-3652.

F

Fabris, C., Toniutto, P., Scott, C. A., Falleti, E., Avellini, C., Del Forno, M., ... & Pirisi, M. (2001). Serum iron indices as a measure of iron deposits in chronic hepatitis C. *Clinica chimica acta*, 304(1), 49-55.

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(6), 3753-3760.

Falcón, V., Acosta-Rivero, N., China, G., Gaviñondo, J., de la Rosa, M. C., Menéndez, I., ... & Noa, M. (2003). Ultrastructural evidences of HCV infection in hepatocytes of chronically HCV-infected patients. *Biochemical and biophysical research communications*, 305(4), 1085-1090.

Falcón, V., Acosta-Rivero, N., González, S., Dueñas-Carrera, S., Martínez-Donato, G., Menéndez, I., ... & Kouri, J. (2017). Ultrastructural and biochemical basis for hepatitis C virus morphogenesis. *Virus genes*, 53(2), 151-164.

Falson, P., Bartosch, B., Alsaleh, K., Tews, B. A., Loquet, A., Ciczora, Y., ... & Pécheur, E. I. (2015). Hepatitis C virus envelope glycoprotein E1 forms trimers at the surface of the virion. *Journal of virology*, 89(20), 10333-10346.

Farci, P., Shimoda, A., Wong, D., Cabezon, T., De Gioannis, D., Strazzera, A., Shimizu, Y., Shapiro, M., Alter, H. J. & Purcell, R. H. (1996). Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees by hyperimmune serum against the hypervariable region 1 of the envelope 2 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(26), 15394-15399.

Farhat, R., Séron, K., Ferlin, J., Fénéant, L., Belouzard, S., Goueslain, L., ... & Rouillé, Y. (2016). Identification of class II ADP-ribosylation factors as cellular factors required for hepatitis C virus replication. *Cellular microbiology*.

Farquhar, M. J., Harris, H. J., Diskar, M., Jones, S., Mee, C. J., Nielsen, S. U., ... & Howl, J. (2008). Protein kinase A-dependent step (s) in hepatitis C virus entry and infectivity. *Journal of virology*, 82(17), 8797-8811.

- Farquhar, M. J., Hu, K., Harris, H. J., Davis, C., Brimacombe, C. L., Fletcher, S. J., ... & McKeating, J. A. (2012). Hepatitis C virus induces CD81 and claudin-1 endocytosis. *Journal of virology*, 86(8), 4305-4316.
- Fausto, N., Campbell, J. S., & Riehle, K. J. (2006). Liver regeneration *Hepatology* 43. S45-S53.
- Feinstone, S. M., Alter, H. J., Dienes, H. P., Shimizu, Y., Popper, H., Blackmore, D., ... & Purcell, R. H. (1981). Non-A, non-B hepatitis in chimpanzees and marmosets. *Journal of Infectious Diseases*, 144(6), 588-598.
- Feinstone, S. M., Kapikian, A. Z., & Purcell, R. H. (1973). Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a viruslike antigen associated with acute illness. *Science*, 182(4116), 1026-1028.
- 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. *New England Journal of Medicine*, 292(15), 767-770.
- Feld, J. J., & Hoofnagle, J. H. (2005). Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. *Nature*, 436(7053), 967-972.
- Felmlee, D. J., Sheridan, D. A., Bridge, S. H., Nielsen, S. U., Milne, R. W., Packard, C. J., ... & Bassendine, M. F. (2010). Intravascular transfer contributes to postprandial increase in numbers of very-low-density hepatitis C virus particles. *Gastroenterology*, 139(5), 1774-1783.
- Fénéant, L., Levy, S., & Cocquerel, L. (2014). CD81 and hepatitis C virus (HCV) infection. *Viruses*, 6(2), 535-572.
- Fiorucci, M., Boulant, S., Fournillier, A., Abraham, J. D., Lavergne, J. P., Paranhos-Baccala, 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(4), 1149-1162.
- Flint, M., Logvinoff, C., Rice, C. M., & McKeating, J. A. (2004). Characterization of infectious retroviral pseudotype particles bearing hepatitis C virus glycoproteins. *Journal of virology*, 78(13), 6875-6882.
- Flint, M., Thomas, J. M., Maidens, C. M., Shotton, C., Levy, S., Barclay, W. S., & McKeating, J. A. (1999). Functional analysis of cell surface-expressed hepatitis C virus E2 glycoprotein. *Journal of virology*, 73(8), 6782-6790.
- Flint, M., von Hahn, T., Zhang, J., Farquhar, M., Jones, C. T., Balfe, P., ... & McKeating, J. A. (2006). Diverse CD81 proteins support hepatitis C virus infection. *Journal of virology*, 80(22), 11331-11342.
- Fofana, I., Zona, L., Thumann, C., Heydmann, L., Durand, S. C., Lupberger, J., ... & McKeating, J. A. (2013). Functional analysis of claudin-6 and claudin-9 as entry factors for hepatitis C virus infection of human hepatocytes by using monoclonal antibodies. *Journal of virology*, 87(18), 10405-10410.
- Folgori, A., Capone, S., Ruggeri, L., Meola, A., Sporeno, E., Ercole, B. B., ... & Lahm, A. (2006). A T-cell HCV vaccine eliciting effective immunity against heterologous virus challenge in chimpanzees. *Nature medicine*, 12(2), 190-197.
- Forns, X., Purcell, R. H., & Bukh, J. (1999). Quasispecies in viral persistence and pathogenesis of hepatitis C virus. *Trends in microbiology*, 7(10), 402-410.

- Forns, X., Thimme, R., Govindarajan, S., Emerson, S. U., Purcell, R. H., Chisari, F. V., & Bukh, J. (2000). Hepatitis C virus lacking the hypervariable region 1 of the second envelope protein is infectious and causes acute resolving or persistent infection in chimpanzees. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*(24), 13318-13323.
- Fournier, C., Sureau, C., Coste, J., Ducos, J., Pageaux, G., Larrey, D., ... & Maurel, P. (1998). In vitro infection of adult normal human hepatocytes in primary culture by hepatitis C virus. *Journal of General Virology*, *79*(10), 2367-2374.
- Freedman, H., Logan, M. R., Hockman, D., Leman, J. K., Law, J. L. M., & Houghton, M. (2017). Computational Prediction of the Heterodimeric and Higher-Order Structure of gpE1/gpE2 Envelope Glycoproteins Encoded by Hepatitis C Virus. *Journal of Virology*, *91*(8), e02309-16.
- 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*(1), 380-392.
- Fukutomi, T., Zhou, Y., Kawai, S., Eguchi, H., Wands, J. R., & Li, J. (2005). Hepatitis C virus core protein stimulates hepatocyte growth: Correlation with upregulation of wnt β 1 expression. *Hepatology*, *41*(5), 1096-1105.
- Furuse, M., Hirase, T., Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S., & Tsukita, S. (1993). Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol*, *123*(6 Pt 2), 1777-1788.
- Furuse, M., Sasaki, H., Fujimoto, K., & Tsukita, S. (1998). A single gene product, claudin-1 or-2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. *The Journal of cell biology*, *143*(2), 391-401.

G

- Gal-Tanamy, M., Keck, Z. Y., Yi, M., McKeating, J. A., Patel, A. H., Fong, S. K., & Lemon, S. M. (2008). In vitro selection of a neutralization-resistant hepatitis C virus escape mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(49), 19450-19455.
- Gallinari, P., Brennan, D., Nardi, C., Brunetti, M., Tomei, L., Steinkühler, C., & De Francesco, R. (1998). Multiple enzymatic activities associated with recombinant NS3 protein of hepatitis C virus. *Journal of virology*, *72*(8), 6758-6769.
- Galossi, A., Guarisco, R., Bellis, L., & Puoti, C. (2007). Extrahepatic manifestations of chronic HCV infection. *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases*, *16*(1), 65.
- Ganong, W.F. (2005) Review of medical physiology (LANGE Basic Science), 22nd edn. *McGraw-Hill Medical*, New York.
- Gao, M., Nettles, R. E., Belema, M., Snyder, L. B., Nguyen, V. N., Fridell, R. A., ... & Lemm, J. A. (2010). Chemical genetics strategy identifies an HCV NS5A inhibitor with a potent clinical effect. *Nature*, *465*(7294), 96-100.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(8), 4498-4503.

- 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*(5), 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*(21), 10999-11009.
- 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*(22), 11074-11081.
- Gaudin, Y., Tuffereau, C., Segretain, D., Knossow, M., & Flamand, A. (1991). Reversible conformational changes and fusion activity of rabies virus glycoprotein. *Journal of virology*, *65*(9), 4853-4859.
- Ge, P., & Zhou, Z. H. (2014). Chaperone fusion proteins aid entropy-driven maturation of class II viral fusion proteins. *Trends in microbiology*, *22*(2), 100-106.
- Gentsch, J., Brohm, C., Steinmann, E., Friesland, M., Menzel, N., Vieyres, G., ... & Pietschmann, T. (2013). Hepatitis C virus p7 is critical for capsid assembly and envelopment. *PLoS Pathog*, *9*(5), e1003355.
- Gerlach, J. T., Diepolder, H. M., Jung, M. C., Gruener, N. H., Schraut, W. W., Zachoval, R., ... & Pape, G. R. (1999). Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus-specific CD4+ T-cell response in acute hepatitis C. *Gastroenterology*, *117*(4), 933-941.
- Gerlach, J. T., Diepolder, H. M., Zachoval, R., Gruener, N. H., Jung, M. C., Ulsenheimer, A., Schraut, W. W., Schirren, C. A., Waechtler, M., Backmund, M. & Pape, G. R. (2003). Acute hepatitis C: high rate of both spontaneous and treatment-induced viral clearance. *Gastroenterology*, *125*(1), 80-88.
- Germain, M. A., Chatel-Chaix, L., Gagné, B., Bonneil, E., Thibault, P., Pradezynski, F., ... & Lamarre, D. (2014). Elucidating novel hepatitis C virus–host interactions using combined mass spectrometry and functional genomics approaches. *Molecular & Cellular Proteomics*, *13*(1), 184-203.
- Germi, R., Crance, J. M., Garin, D., Guimet, J., Lortat-Jacob, H., Ruigrok, R. W., ... & Drouet, E. (2002). Cellular glycosaminoglycans and low density lipoprotein receptor are involved in hepatitis C virus adsorption. *Journal of medical virology*, *68*(2), 206-215.
- Giang, E., Dorner, M., Prentoe, J. C., Dreux, M., Evans, M. J., Bukh, J., ... & Law, M. (2012). Human broadly neutralizing antibodies to the envelope glycoprotein complex of hepatitis C virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(16), 6205-6210.
- Giersch, K., Helbig, M., Volz, T., Allweiss, L., Mancke, L. V., Lohse, A. W., ... & Dandri, M. (2014). Persistent hepatitis D virus mono-infection in humanized mice is efficiently converted by hepatitis B virus to a productive co-infection. *Journal of hepatology*, *60*(3), 538-544.
- 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*(13), 8400-8409.
- 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*(9), 5487-5492.

- Gottwein, J. M., Jensen, S. B., Li, Y. P., Ghanem, L., Scheel, T. K., Serre, S. B., ... & Bukh, J. (2013). Combination treatment with hepatitis C virus protease and NS5A inhibitors is effective against recombinant genotype 1a, 2a, and 3a viruses. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57(3), 1291-1303.
- Gottwein, J. M., Scheel, T. K., Hoegh, A. M., Lademann, J. B., Eugen-Olsen, J., Lisby, G., & Bukh, J. (2007). Robust hepatitis C genotype 3a cell culture releasing adapted intergenotypic 3a/2a (S52/JFH1) viruses. *Gastroenterology*, 133(5), 1614-1626.
- Gottwein, J. M., Scheel, T. K., Jensen, T. B., Ghanem, L., & Bukh, J. (2011). Differential efficacy of protease inhibitors against HCV genotypes 2a, 3a, 5a, and 6a NS3/4A protease recombinant viruses. *Gastroenterology*, 141(3), 1067-1079.
- Gottwein, J. M., Scheel, T. K., Jensen, T. B., Lademann, J. B., Prentoe, J. C., Knudsen, M. L., ... & 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(2), 364-377.
- Goueslain, L., Alsaleh, K., Horellou, P., Roingeard, P., Descamps, V., Duverlie, G., ... & Rouillé, Y. (2010). Identification of GBF1 as a cellular factor required for hepatitis C virus RNA replication. *Journal of virology*, 84(2), 773-787.
- Gouklani, H., Bull, R. A., Beyer, C., Coulibaly, F., Gowans, E. J., Drummer, H. E., ... & Haqshenas, G. (2012). Hepatitis C virus nonstructural protein 5B is involved in virus morphogenesis. *Journal of virology*, 86(9), 5080-5088.
- Gouttenoire, J., Castet, V., Montserret, R., Arora, N., Raussens, V., Ruyschaert, J. M., ... & Moradpour, D. (2009). Identification of a novel determinant for membrane association in hepatitis C virus nonstructural protein 4B. *Journal of virology*, 83(12), 6257-6268.
- Gouttenoire, J., Penin, F., & Moradpour, D. (2010). Hepatitis C virus nonstructural protein 4B: a journey into unexplored territory. *Reviews in medical virology*, 20(2), 117-129.
- Gouttenoire, J., Roingeard, P., Penin, F., & Moradpour, D. (2010). Amphipathic α -helix AH2 is a major determinant for the oligomerization of hepatitis C virus nonstructural protein 4B. *Journal of virology*, 84(24), 12529-12537.
- Grakoui, A. R. A. S. H., 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(3), 1385-1395.
- Gray, H., & Lewis, W. H. (2000) Gray's anatomy of the human body, 20th edn. *Bartleby*, New York.
- Grebely, J., Page, K., Sacks□Davis, R., Loeff, M. S., Rice, T. M., Bruneau, J., ... & Kim, A. Y. (2014). The effects of female sex, viral genotype, and IL28B genotype on spontaneous clearance of acute hepatitis C virus infection. *Hepatology*, 59(1), 109-120.
- Greber, U. F., & Gastaldelli, M. (2007). Junctional gating: the achilles' heel of epithelial cells in pathogen infection. *Cell host & microbe*, 2(3), 143-146.
- Grobler, J. A., Markel, E. J., Fay, J. F., Graham, D. J., Simcoe, A. L., Ludmerer, S. W., ... & Flores, O. A. (2003). Identification of a key determinant of hepatitis C virus cell culture adaptation in domain II of NS3 helicase. *Journal of Biological Chemistry*, 278(19), 16741-16746.

- Grove, J., Huby, T., Stamatakis, Z., Vanwolleghem, T., Meuleman, P., Farquhar, M., ... & Balfe, P. (2007). Scavenger receptor BI and BII expression levels modulate hepatitis C virus infectivity. *Journal of virology*, *81*(7), 3162-3169.
- Grove, J., Huby, T., Stamatakis, Z., Vanwolleghem, T., Meuleman, P., Farquhar, M., ... & Balfe, P. (2007). Scavenger receptor BI and BII expression levels modulate hepatitis C virus infectivity. *Journal of virology*, *81*(7), 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*(24), 12020-12029.
- Gruner, N. H., Gerlach, T. J., Jung, M. C., Diepolder, H. M., Schirren, C. A., Schraut, W. W., ... & Cerny, A. (2000). Association of Hepatitis C Virus—Specific CD8+ T Cells with Viral Clearance in Acute Hepatitis C. *Journal of Infectious Diseases*, *181*(5), 1528-1536.
- Guedj, J., Dahari, H., Rong, L., Sansone, N. D., Nettles, R. E., Cotler, S. J., ... & Perelson, A. S. (2013). Modeling shows that the NS5A inhibitor daclatasvir has two modes of action and yields a shorter estimate of the hepatitis C virus half-life. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(10), 3991-3996.
- Guidotti, L. G., & Chisari, F. V. (2006). Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, *1*, 23-61.
- Gutti, T. L., Knibbe, J. S., Makarov, E., Zhang, J., Yannam, G. R., Gorantla, S., ... & Osna, N. A. (2014). Human hepatocytes and hemolymphoid dual reconstitution in treosulfan-conditioned uPA-NOG mice. *The American journal of pathology*, *184*(1), 101-109.

H

- Habersetzer, F., Honnet, G., Bain, C., Maynard-Muet, M., Leroy, V., Zarski, J. P., ... & Trépo, C. (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.
- Haberstroh, A., Schnober, E. K., Zeisel, M. B., Carolla, P., Barth, H., Blum, H. E., ... & Depla, E. (2008). Neutralizing host responses in hepatitis C virus infection target viral entry at postbinding steps and membrane fusion. *Gastroenterology*, *135*(5), 1719-1728.
- 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*(26), 17657-17667.
- Hajarizadeh, B., Grebely, J., & Dore, G. J. (2013). Epidemiology and natural history of HCV infection. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, *10*(9), 553-562.
- Harrison, S. C. (2008). Viral membrane fusion. *Nature structural & molecular biology*, *15*(7), 690-698.
- Heile, J. M., Fong, Y. L., Rosa, D., Berger, K., Saletti, G., Campagnoli, S., ... & Dong, C. (2000). Evaluation of hepatitis C virus glycoprotein E2 for vaccine design: an endoplasmic reticulum-retained recombinant protein is superior to secreted recombinant protein and DNA-based vaccine candidates. *Journal of virology*, *74*(15), 6885-6892.

- Heldwein, E. E., Lou, H., Bender, F. C., Cohen, G. H., Eisenberg, R. J., & Harrison, S. C. (2006). Crystal structure of glycoprotein B from herpes simplex virus 1. *Science*, *313*(5784), 217-220.
- Helle, F., Brochot, E., Fournier, C., Descamps, V., Izquierdo, L., Hoffmann, T. W., ... & Wychowski, C. (2013). Permissivity of primary human hepatocytes and different hepatoma cell lines to cell culture adapted hepatitis C virus. *PLoS One*, *8*(8), e70809.
- Helle, F., Goffard, A., Morel, V., Duverlie, G., McKeating, J., Keck, Z. Y., ... & 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*(15), 8101-8111.
- Helle, F., Vieyres, G., Elkrief, L., Popescu, C. I., Wychowski, C., Descamps, V., ... & 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*(22), 11905-11915.
- Hemler, M. E. (2003). Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain. *Annual review of cell and developmental biology*, *19*(1), 397-422.
- Herker, E., Harris, C., Hernandez, C., Carpentier, A., Kaehlcke, K., Rosenberg, A. R., ... & Ott, M. (2010). Efficient hepatitis C virus particle formation requires diacylglycerol acyltransferase-1. *Nature medicine*, *16*(11), 1295-1298.
- Herrmann, E., Neumann, A. U., Schmidt, J. M., & Zeuzem, S. (2000). Hepatitis C virus kinetics. *Antiviral therapy*, *5*(2), 85-90.
- Hijikata, M., Kato, N., Ootsuyama, Y., Nakagawa, M., & Shimotohno, K. (1991). Gene mapping of the putative structural region of the hepatitis C virus genome by in vitro processing analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *88*(13), 5547-5551.
- Hijikata, M., Mizushima, H., Tanji, Y., Komoda, Y., Hirowatari, Y., Akagi, T., ... & Shimotohno, K. (1993). Proteolytic processing and membrane association of putative nonstructural proteins of hepatitis C virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *90*(22), 10773-10777.
- Hoekstra, L. T., de Graaf, W., Nibourg, G. A., Heger, M., Bennink, R. J., Stieger, B., & van Gulik, T. M. (2013). Physiological and biochemical basis of clinical liver function tests: a review. *Annals of surgery*, *257*(1), 27-36.
- Honda, M., Brown, E. A., & Lemon, S. M. (1996). Stability of a stem-loop involving the initiator AUG controls the efficiency of internal initiation of translation on hepatitis C virus RNA. *Rna*, *2*(10), 955-968.
- Hopcraft, S. E., & Evans, M. J. (2015). Selection of a hepatitis C virus with altered entry factor requirements reveals a genetic interaction between the E1 glycoprotein and claudins. *Hepatology*, *62*(4), 1059-1069.
- Horner, S. M., & Gale Jr, M. (2013). Regulation of hepatic innate immunity by hepatitis C virus. *Nature medicine*, *19*(7), 879-888.
- Houghton, M. (2011). Prospects for prophylactic and therapeutic vaccines against the hepatitis C viruses. *Immunological reviews*, *239*(1), 99-108.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(12), 7271-7276.

Hsu, S. H., Yeh, M. L., & Wang, S. N. (2013). New insights in recurrent HCV infection after liver transplantation. *Clinical and Developmental Immunology*, 2013.

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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(14), 5848-5853.

Hueging, K., Doepke, M., Vieyres, G., Bankwitz, D., Frentzen, A., Doerrbecker, J., ... & Pietschmann, T. (2014). Apolipoprotein E codetermines tissue tropism of hepatitis C virus and is crucial for viral cell-to-cell transmission by contributing to a postenvelopment step of assembly. *Journal of virology*, 88(3), 1433-1446.

I

Icard, V., Diaz, O., Scholtes, C., Perrin-Cocon, L., Ramière, C., Bartenschlager, R., ... & André, P. (2009). Secretion of hepatitis C virus envelope glycoproteins depends on assembly of apolipoprotein B positive lipoproteins. *PloS one*, 4(1), e4233.

Ikeda, M., Yi, M., Li, K., & Lemon, S. M. (2002). Selectable subgenomic and genome-length dicistronic RNAs derived from an infectious molecular clone of the HCV-N strain of hepatitis C virus replicate efficiently in cultured Huh7 cells. *Journal of virology*, 76(6), 2997-3006.

J

Jackson, G., & Whitfield, P. (1985) Digestion: fueling the system (Library of the Human Body). *Torstar Books*, New York.

Jacobson, I. M., Dore, G. J., Foster, G. R., Fried, M. W., Radu, M., Rafalsky, V. V., ... & Ouwerkerk-Mahadevan, S. (2014). Simeprevir with pegylated interferon alfa 2a plus ribavirin in treatment-naive patients with chronic hepatitis C virus genotype 1 infection (QUEST-1): a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet*, 384(9941), 403-413.

Jacobson, I. M., McHutchison, J. G., Dusheiko, G., Di Bisceglie, A. M., Reddy, K. R., Bzowej, N. H., ... & George, J. (2011). Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection. *New England Journal of Medicine*, 364(25), 2405-2416.

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(24), 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(13), 7256-7267.

Jiang, J., Wu, X., Tang, H., & Luo, G. (2013). Apolipoprotein E mediates attachment of clinical hepatitis C virus to hepatocytes by binding to cell surface heparan sulfate proteoglycan receptors. *PloS one*, 8(7), e67982.

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 Pathog*, 6(12), e1001233.

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(16), 8374-8383.

Jones, D. M., Atoom, A. M., Zhang, X., Kottlil, S., & Russell, R. S. (2011). A genetic interaction between the core and NS3 proteins of hepatitis C virus is essential for production of infectious virus. *Journal of virology*, 85(23), 12351-12361.

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(5), 2163-2177.

Jopling, C. L. (2008). Regulation of hepatitis C virus by microRNA-122. *Biochemical Society Transactions*, 36(6), 1220-1223.

Jopling, C. L., Yi, M., Lancaster, A. M., Lemon, S. M., & Sarnow, P. (2005). Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science*, 309(5740), 1577-1581.

Kadlec, J., Loureiro, S., Abrescia, N. G., Stuart, D. I., & Jones, I. M. (2008). The postfusion structure of baculovirus gp64 supports a unified view of viral fusion machines. *Nature structural & molecular biology*, 15(10), 1024-1030.

K

Kao, C. C., Yi, G., & Huang, H. C. (2016). The core of hepatitis C virus pathogenesis. *Current opinion in virology*, 17, 66-73.

Kapadia, S. B., & Chisari, F. V. (2005). Hepatitis C virus RNA replication is regulated by host geranylgeranylation and fatty acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(7), 2561-2566.

Karamitros, T., Kakkanas, A., Katsoulidou, A., Sypsa, V., Dalagiorgou, G., Mavromara, P., & Hatzakis, A. (2012). Detection of specific antibodies to HCV□ARF/CORE+ 1 protein in patients treated with pegylated interferon plus ribavirin. *Journal of viral hepatitis*, 19(3), 182-188.

Kato, T., Choi, Y., Elmowalid, G., Sapp, R. K., Barth, H., Furusaka, A., ... & Liang, T. J. (2008). Hepatitis C virus JFH1 strain infection in chimpanzees is associated with low pathogenicity and emergence of an adaptive mutation. *Hepatology*, 48(3), 732-740.

Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Furusaka, A., Tokushige, K., Mizokami, M., & Wakita, T. (2003). Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. *Gastroenterology*, 125(6), 1808-1817.

Kaul, A., Stauffer, S., Berger, C., Pertel, T., Schmitt, J., Kallis, S., ... & 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(8), e1000546.

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(23), 13168-13179.

- Kawai, T., & Akira, S. (2011). Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*, 34(5), 637-650.
- Keck, Z. Y., Saha, A., Xia, J., Wang, Y., Lau, P., Krey, T., ... & Fong, S. K. (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(20), 10451-10463.
- Keck, Z. Y., Sung, V. M., Perkins, S., Rowe, J., Paul, S., Liang, T. J., ... & Fong, S. K. (2004b). Human monoclonal antibody to hepatitis C virus E1 glycoprotein that blocks virus attachment and viral infectivity. *Journal of virology*, 78(13), 7257-7263.
- Keck, Z., Wang, W., Wang, Y., Lau, P., Carlsen, T. H., Prentoe, J., ... & Fong, S. K. (2013). Cooperativity in virus neutralization by human monoclonal antibodies to two adjacent regions located at the amino terminus of hepatitis C virus E2 glycoprotein. *Journal of virology*, 87(1), 37-51.
- Khan, A. G., Whidby, J., Miller, M. T., Scarborough, H., Zatorski, A. V., Cygan, A., ... & Grakoui, A. (2014). Structure of the core ectodomain of the hepatitis C virus envelope glycoprotein 2. *Nature*, 509(7500), 381-384.
- Kieft, J. S., Zhou, K., Grech, A., Jubin, R., & Doudna, J. A. (2002). Crystal structure of an RNA tertiary domain essential to HCV IRES-mediated translation initiation. *Nature Structural & Molecular Biology*, 9(5), 370-374.
- Kielian, M. (2006). Class II virus membrane fusion proteins. *Virology*, 344(1), 38-47.
- Kielian, M., & Rey, F. A. (2006). Virus membrane-fusion proteins: more than one way to make a hairpin. *Nature Reviews Microbiology*, 4(1), 67-76.
- Kielian, M., Chanel-Vos, C., & Liao, M. (2010). Alphavirus entry and membrane fusion. *Viruses*, 2(4), 796-825.
- Kim, S., Ishida, H., Yamane, D., Yi, M., Swinney, D. C., Fong, S., & Lemon, S. M. (2013). Contrasting roles of mitogen-activated protein kinases in cellular entry and replication of hepatitis C virus: MKNK1 facilitates cell entry. *Journal of virology*, 87(8), 4214-4224.
- Kim, S., Welsch, C., Yi, M., & Lemon, S. M. (2011). Regulation of the production of infectious genotype 1a hepatitis C virus by NS5A domain III. *Journal of virology*, 85(13), 6645-6656.
- Kinge, C. N. W., Espiritu, C., Prabdial-Sing, N., Sithebe, N. P., Saeed, M., & Rice, C. M. (2014). Hepatitis C virus genotype 5a subgenomic replicons for evaluation of direct-acting antiviral agents. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 58(9), 5386-5394.
- 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(11), 6814-6826.
- Klenerman, P., & Thimme, R. (2012). T cell responses in hepatitis C: the good, the bad and the unconventional. *Gut*, 61(8), 1226-1234.
- Klenk, H. D., & Garten, W. (1994). Host cell proteases controlling virus pathogenicity. *Trends in microbiology*, 2(2), 39-43.

- Köklü, S., Köksal, I., Akarca, U. S., Balkan, A., Güner, R., Demirezen, A., ... & Idilman, R. (2017). Daclatasvir plus asunaprevir dual therapy for chronic HCV genotype 1b infection: results of Turkish early access program. *Annals of Hepatology: Official Journal of the Mexican Association of Hepatology*, 16(1).
- 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(5325), 570-574.
- Kolykhalov, A. A., Feinstone, S. M., & Rice, C. M. (1996). Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *Journal of virology*, 70(6), 3363-3371.
- 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(4), 2046-2051.
- Kong, L., Giang, E., Nieuwma, T., Kadam, R. U., Cogburn, K. E., Hua, Y., ... & Wilson, I. A. (2013). Hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein core structure. *Science*, 342(6162), 1090-1094.
- Kong, L., Giang, E., Nieuwma, T., Robbins, J. B., Deller, M. C., Stanfield, R. L., ... & Law, M. (2012a). Structure of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 antigenic site 412 to 423 in complex with antibody AP33. *Journal of virology*, 86(23), 13085-13088.
- Kong, L., Giang, E., Robbins, J. B., Stanfield, R. L., Burton, D. R., Wilson, I. A., & Law, M. (2012b). Structural basis of hepatitis C virus neutralization by broadly neutralizing antibody HCV1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(24), 9499-9504.
- Kong, L., Kadam, R. U., Giang, E., Ruwona, T. B., Nieuwma, T., Culhane, J. C., ... & Law, M. (2015). Structure of hepatitis C virus envelope glycoprotein E1 antigenic site 314-324 in complex with antibody IGH526. *Journal of molecular biology*, 427(16), 2617-2628.
- Kosaka, K., Hiraga, N., Imamura, M., Yoshimi, S., Murakami, E., Nakahara, T., ... & Abe, H. (2013). A novel TK-NOG based humanized mouse model for the study of HBV and HCV infections. *Biochemical and biophysical research communications*, 441(1), 230-235.
- 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(11), 5308-5320.
- Krey, T., d'Alayer, J., Kikuti, C. M., Saulnier, A., Damier-Piolle, L., Petitpas, I., ... & England, P. (2010). The disulfide bonds in glycoprotein E2 of hepatitis C virus reveal the tertiary organization of the molecule. *PLoS Pathog*, 6(2), e1000762.
- Krey, T., Thiel, H. J., & Rümenapf, T. (2005). Acid-resistant bovine pestivirus requires activation for pH-triggered fusion during entry. *Journal of virology*, 79(7), 4191-4200.
- Kumada, H., Suzuki, F., Suzuki, Y., Toyota, J., Karino, Y., Chayama, K., ... & Tamura, E. (2016). Randomized comparison of daclatasvir+ asunaprevir versus telaprevir+ peginterferon/ribavirin in Japanese hepatitis C virus patients. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 31(1), 14-22.
- Kumar, A., Yang, Y. L., Flati, V., Der, S., Kadereit, S., Deb, A., ... & Williams, B. R. (1997). Deficient cytokine signaling in mouse embryo fibroblasts with a targeted deletion in the PKR gene: role of IRF1 and NF- κ B. *The EMBO journal*, 16(2), 406-416.

Kumar, D., Farrell, G. C., Fung, C., & George, J. (2002). Hepatitis C virus genotype 3 is cytopathic to hepatocytes: reversal of hepatic steatosis after sustained therapeutic response. *Hepatology*, 36(5), 1266-1272.

Kunkel, M., Lorinczi, M., Rijnbrand, R., Lemon, S. M., & Watowich, S. J. (2001). Self-assembly of nucleocapsid-like particles from recombinant hepatitis C virus core protein. *Journal of virology*, 75(5), 2119-2129.

L

Lackner, T., Müller, A., Pankraz, A., Becher, P., Thiel, H. J., Gorbalenya, A. E., & Tautz, N. (2004). Temporal modulation of an autoprotease is crucial for replication and pathogenicity of an RNA virus. *Journal of virology*, 78(19), 10765-10775.

Lam, A. M., Espiritu, C., Bansal, S., Steuer, H. M. M., Niu, C., Zennou, V., ... & Furman, P. A. (2012). Genotype and subtype profiling of PSI-7977 as a nucleotide inhibitor of hepatitis C virus. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, AAC-00054.

Lan, K. H., Sheu, M. L., Hwang, S. J., Yen, S. H., Shioh-Yi, C., Wu, J. C., ... & Shou-Dong, L. (2002). HCV NS5A interacts with p53 and inhibits p53-mediated apoptosis. *Oncogene*, 21(31), 4801.

Lapierre, P., Troesch, M., Alvarez, F., & Soudeyns, H. (2011). Structural basis for broad neutralization of hepatitis C virus quasispecies. *PloS one*, 6(10), e26981.

Lauer, G. M., & Walker, B. D. (2001). Hepatitis C virus infection. *New England journal of medicine*, 345(1), 41-52.

Lavie, M., Goffard, A., & Dubuisson, J. (2007). Assembly of a functional HCV glycoprotein heterodimer. *Current issues in molecular biology*, 9(2), 71.

Lavie, M., Sarrazin, S., Montserret, R., Descamps, V., Baumert, T. F., Duverlie, G., ... & Dubuisson, J. (2014). Identification of conserved residues in hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 that modulate virus dependence on CD81 and SR-B1 entry factors. *Journal of virology*, 88(18), 10584-10597.

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. *Journal of Biological Chemistry*, 281(7), 3909-3917.

Lavillette, D., Pécheur, E. I., Donot, P., Fresquet, J., Molle, J., Corbau, R., ... & 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(16), 8752-8765.

Lavillette, D., Tarr, A. W., Voisset, C., Donot, P., Bartosch, B., Bain, C., ... & Cosset, F. L. (2005). Characterization of host range and cell entry properties of the major genotypes and subtypes of hepatitis C virus. *Hepatology*, 41(2), 265-274.

Law, L. M. J., Landi, A., Magee, W. C., Tyrrell, D. L., & Houghton, M. (2013). Progress towards a hepatitis C virus vaccine. *Emerging microbes & infections*, 2(11), e79.

- Law, M., Maruyama, T., Lewis, J., Giang, E., Tarr, A. W., Stamataki, Z., ... & Ball, J. K. (2008). Broadly neutralizing antibodies protect against hepatitis C virus quasispecies challenge. *Nature medicine*, *14*(1), 25-27.
- Lechner, F., Wong, D. K., Dunbar, P. R., Chapman, R., Chung, R. T., Dohrenwend, P., ... & Walker, B. D. (2000). Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *Journal of Experimental Medicine*, *191*(9), 1499-1512.
- Lee, A. H., Scapa, E. F., Cohen, D. E., & Glimcher, L. H. (2008). Regulation of hepatic lipogenesis by the transcription factor XBP1. *Science*, *320*(5882), 1492-1496.
- Lee, M., Hwang, J. Y., Yang, J. W., Jo, E. J., Min, S. H., Lee, J. Y., Kim, H. Y., Bartenschlager, R., Bae, Y. S., & Windisch, M. P. (2015). Characterization of a novel small molecule inhibitor targeting hepatitis C virus glycoprotein E1. In *22nd International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses*, Strasbourg, France
- Lee, N. P., & Luk, J. M. (2010). Hepatic tight junctions: from viral entry to cancer metastasis. *World journal of gastroenterology*.
- Lefèvre, M., Felmlee, D. J., Parnot, M., Baumert, T. F., & Schuster, C. (2014). Syndecan 4 is involved in mediating HCV entry through interaction with lipoviral particle-associated apolipoprotein E. *PLoS One*, *9*(4), e95550.
- Leverero, M. (2006). Viral hepatitis and liver cancer: the case of hepatitis C. *Oncogene*, *25*(27), 3834-3847.
- Levy, S., & Shoham, T. (2005). Protein-protein interactions in the tetraspanin web. *Physiology*, *20*(4), 218-224.
- Li, H., Yang, X., Yang, G., Hong, Z., Zhou, L., Yin, P., ... & Zhang, L. (2014). Hepatitis C virus NS5A hijacks ARFGAP1 to maintain a phosphatidylinositol 4-phosphate-enriched microenvironment. *Journal of virology*, *88*(11), 5956-5966.
- Li, K., Foy, E., Ferreon, J. C., Nakamura, M., Ferreon, A. C., Ikeda, M., ... & Lemon, S. M. (2005). Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(8), 2992-2997.
- Li, Q., Pène, V., Krishnamurthy, S., Cha, H., & Liang, T. J. (2013). Hepatitis C virus infection activates an innate pathway involving IKK-[alpha] in lipogenesis and viral assembly. *Nature medicine*, *19*(6), 722-729.
- Li, X., Jiang, H., Qu, L., Yao, W., Cai, H., Chen, L., & Peng, T. (2014). Hepatocyte nuclear factor 4 α and downstream secreted phospholipase A2 GXIIB regulate production of infectious hepatitis C virus. *Journal of virology*, *88*(1), 612-627.
- Li, Y. P., Ramirez, S., Gottwein, J. M., Scheel, T. K., Mikkelsen, L., Purcell, R. H., & Bukh, J. (2012a). Robust full-length hepatitis C virus genotype 2a and 2b infectious cultures using mutations identified by a systematic approach applicable to patient strains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(18), E1101-E1110.
- Li, Y. P., Ramirez, S., Jensen, S. B., Purcell, R. H., Gottwein, J. M., & Bukh, J. (2012b). Highly efficient full-length hepatitis C virus genotype 1 (strain TN) infectious culture system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(48), 19757-19762.

- Li, Y., Masaki, T., Yamane, D., McGivern, D. R., & Lemon, S. M. (2013). Competing and noncompeting activities of miR-122 and the 5' exonuclease Xrn1 in regulation of hepatitis C virus replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(5), 1881-1886.
- Li, Y., Wang, J., Kanai, R., & Modis, Y. (2013). Crystal structure of glycoprotein E2 from bovine viral diarrhoea virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(17), 6805-6810.
- Lim, Y. S., & Hwang, S. B. (2011). Hepatitis C virus NS5A protein interacts with phosphatidylinositol 4-kinase type III α and regulates viral propagation. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(13), 11290-11298.
- Lin, C., Lindenbach, B. D., Pragai, B. M., McCourt, D. W., & Rice, C. M. (1994). Processing in the hepatitis C virus E2-NS2 region: identification of p7 and two distinct E2-specific products with different C termini. *Journal of Virology*, *68*(8), 5063-5073.
- Lindenbach, B. D. (2013). Virion assembly and release. In *Hepatitis C Virus: From Molecular Virology to Antiviral Therapy* (pp. 199-218). Springer Berlin Heidelberg.
- Lindenbach, B. D., Evans, M. J., Syder, A. J., Wölk, B., Tellinghuisen, T. L., Liu, C. C., ... & Rice, C. M. (2005). Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science*, *309*(5734), 623-626.
- Lindenbach, B. D., Meuleman, P., Ploss, A., Vanwolleghem, T., Syder, A. J., McKeating, J. A., ... & Rice, C. M. (2006). Cell culture-grown hepatitis C virus is infectious in vivo and can be recultured in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(10), 3805-3809.
- Lindenbach, B. D., Prágai, B. M., Montserret, R., Beran, R. K., 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*(17), 8905-8918.
- 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*(4), 2011-2014.
- Liu, Z., Tian, Y., Machida, K., Lai, M. M., Luo, G., Fong, S. K., & Ou, J. H. J. (2012). Transient activation of the PI3K-AKT pathway by hepatitis C virus to enhance viral entry. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(50), 41922-41930.
- Logvinoff, C., Major, M. E., Oldach, D., Heyward, S., Talal, A., Balfe, P., ... & McKeating, J. A. (2004). Neutralizing antibody response during acute and chronic hepatitis C virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(27), 10149-10154.
- Lohmann, V. (2013). Hepatitis C virus RNA replication. In *Hepatitis C virus: from molecular virology to antiviral therapy* (pp. 167-198). Springer Berlin Heidelberg.
- Lohmann, V., Hoffmann, S., Herian, U., Penin, F., & Bartenschlager, R. (2003). Viral and cellular determinants of hepatitis C virus RNA replication in cell culture. *Journal of virology*, *77*(5), 3007-3019.
- Lohmann, V., Körner, F., Dobierzewska, A., & Bartenschlager, R. (2001). Mutations in hepatitis C virus RNAs conferring cell culture adaptation. *Journal of virology*, *75*(3), 1437-1449.

- 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. *Science*, 285(5424), 110-113.
- Long, G., Hiet, M. S., Windisch, M. P., Lee, J. Y., Lohmann, V., & Bartenschlager, R. (2011). Mouse hepatic cells support assembly of infectious hepatitis C virus particles. *Gastroenterology*, 141(3), 1057-1066.
- Lorenz, I. C., Allison, S. L., Heinz, F. X., & Helenius, A. (2002). Folding and dimerization of tick-borne encephalitis virus envelope proteins prM and E in the endoplasmic reticulum. *Journal of virology*, 76(11), 5480-5491.
- 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(7104), 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(31), 32035-32045.
- Lundin, M., Lindström, H., Grönwall, C., & Persson, M. A. (2006). Dual topology of the processed hepatitis C virus protein NS4B is influenced by the NS5A protein. *Journal of general virology*, 87(11), 3263-3272.
- Lundin, M., Monné, M., Widell, A., Von Heijne, G., & Persson, M. A. (2003). Topology of the membrane-associated hepatitis C virus protein NS4B. *Journal of virology*, 77(9), 5428-5438.
- Lupberger, J., Zeisel, M. B., Xiao, F., Thumann, C., Fofana, I., Zona, L., ... & Royer, C. (2011). EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy. *Nature medicine*, 17(5), 589-595.
- Lyn, R. K., Hope, G., Sherratt, A. R., McLauchlan, J., & Pezacki, J. P. (2013). Bidirectional lipid droplet velocities are controlled by differential binding strengths of HCV core DII protein. *PloS one*, 8(11), e78065.

M

- 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(1), 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(15), 7624-7639.
- Maasoumy, B., & Wedemeyer, H. (2012). Natural history of acute and chronic hepatitis C. *Best practice & research Clinical gastroenterology*, 26(4), 401-412.
- Mack, C. L., Gonzalez-Peralta, R. P., Gupta, N., Leung, D., Narkewicz, M. R., Roberts, E. A., ... & Schwarz, K. B. (2012). NASPGHAN practice guidelines: Diagnosis and management of hepatitis C infection in infants, children, and adolescents. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 54(6), 838-855.
- Madan, V., & Bartenschlager, R. (2015). Structural and functional properties of the hepatitis C virus p7 viroporin. *Viruses*, 7(8), 4461-4481.

- Madan, V., Paul, D., Lohmann, V., & Bartenschlager, R. (2014). Inhibition of HCV replication by cyclophilin antagonists is linked to replication fitness and occurs by inhibition of membranous web formation. *Gastroenterology*, *146*(5), 1361-1372.
- 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*(6), 735-737.
- Manns, M., Pol, S., Jacobson, I. M., Marcellin, P., Gordon, S. C., Peng, C. Y., ... & Yoffe, B. (2014). All-oral daclatasvir plus asunaprevir for hepatitis C virus genotype 1b: a multinational, phase 3, multicohort study. *The Lancet*, *384*(9954), 1597-1605.
- Martin, D. N., & Uprichard, S. L. (2013). Identification of transferrin receptor 1 as a hepatitis C virus entry factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(26), 10777-10782.
- Masaki, T., Matsunaga, S., Takahashi, H., Nakashima, K., Kimura, Y., Ito, M., ... & Endo, Y. (2014). Involvement of hepatitis C virus NS5A hyperphosphorylation mediated by casein kinase I- α in infectious virus production. *Journal of virology*, *88*(13), 7541-7555.
- Masaki, T., Suzuki, R., Murakami, K., Aizaki, H., Ishii, K., Murayama, A., ... & Suzuki, T. (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*(16), 7964-7976.
- Mathiesen, C. K., Prentoe, J., Meredith, L. W., Jensen, T. B., Krarup, H., McKeating, J. A., ... & Bukh, J. (2015). Adaptive mutations enhance assembly and cell-to-cell transmission of a high-titer hepatitis C virus genotype 5a Core-NS2 JFH1-based recombinant. *Journal of virology*, *89*(15), 7758-7775.
- 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*(27), 23865-23876.
- McAllister, C. S., & Samuel, C. E. (2009). The RNA-activated protein kinase enhances the induction of interferon- β and apoptosis mediated by cytoplasmic RNA sensors. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(3), 1644-1651.
- McCaffrey, K., Boo, I., Pountourios, P., & Drummer, H. E. (2007). Expression and characterization of a minimal hepatitis C virus glycoprotein E2 core domain that retains CD81 binding. *Journal of virology*, *81*(17), 9584-9590.
- McCaffrey, K., Boo, I., Tewierek, K., Edmunds, M. L., Pountourios, P., & Drummer, H. E. (2012). Role of conserved cysteine residues in hepatitis C virus glycoprotein e2 folding and function. *Journal of virology*, *86*(7), 3961-3974.
- McCaffrey, K., Gouklani, H., Boo, I., Pountourios, P., & Drummer, H. E. (2011). The variable regions of hepatitis C virus glycoprotein E2 have an essential structural role in glycoprotein assembly and virion infectivity. *Journal of General Virology*, *92*(1), 112-121.
- McCartney, E. M., Eyre, N. S., & Beard, M. R. (2011). Border patrol intensifies for hepatitis C virus entry. *Hepatology*, *54*(4), 1472-1475.
- McKeating, J. A., Zhang, L. Q., Logvinoff, C., Flint, M., Zhang, J., Yu, J., ... & Balfe, P. (2004). Diverse hepatitis C virus glycoproteins mediate viral infection in a CD81-dependent manner. *Journal of virology*, *78*(16), 8496-8505.

- McLauchlan, J. (2009). Lipid droplets and hepatitis C virus infection. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1791(6), 552-559.
- McLauchlan, J., Lemberg, M. K., Hope, G., & Martoglio, B. (2002). Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *The EMBO journal*, 21(15), 3980-3988.
- McMillan, B. (2008). *The illustrated atlas of the human Body*. Reader's Digest.
- McMullan, L. K., Grakoui, A., Evans, M. J., Mihalik, K., Puig, M., Branch, A. D., ... & Rice, C. M. (2007). Evidence for a functional RNA element in the hepatitis C virus core gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(8), 2879-2884.
- Mederacke, I., Wedemeyer, H., Ciesek, S., Steinmann, E., Raupach, R., Wursthorn, K., ... & Tillmann, H. L. (2009). Performance and clinical utility of a novel fully automated quantitative HCV-core antigen assay. *Journal of clinical virology*, 46(3), 210-215.
- 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(23), 11571-11578.
- 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(7), 3555-3560.
- Menzel, N., Fischl, W., Hueging, K., Bankwitz, D., Frentzen, A., Haid, S., ... & Pietschmann, T. (2012). MAP-kinase regulated cytosolic phospholipase A2 activity is essential for production of infectious hepatitis C virus particles. *PLoS Pathog*, 8(7), e1002829.
- Mercer, D. F., Schiller, D. E., Elliott, J. F., Douglas, D. N., Hao, C., Rinfret, A., ... & Tyrrell, D. L. (2001). Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nature medicine*, 7(8), 927-933.
- Messina, J. P., Humphreys, I., Flaxman, A., Brown, A., Cooke, G. S., Pybus, O. G., & Barnes, E. (2015). Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*, 61(1), 77-87.
- Metwally, M. A., Zein, C. O., & Zein, N. N. (2004). Clinical significance of hepatic iron deposition and serum iron values in patients with chronic hepatitis C infection. *The American journal of gastroenterology*, 99(2), 286-291.
- Metz, P., Reuter, A., Bender, S., & Bartenschlager, R. (2013). Interferon-stimulated genes and their role in controlling hepatitis C virus. *Journal of hepatology*, 59(6), 1331-1341.
- Meuleman, P., Albecka, A., Belouzard, S., Vercauteren, K., Verhoye, L., Wychowski, C., ... & Dubuisson, J. (2011). Griffithsin has antiviral activity against hepatitis C virus. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(11), 5159-5167.
- Meuleman, P., Bukh, J., Verhoye, L., Farhoudi, A., Vanwolleghem, T., Wang, R. Y., ... & Leroux-Roels, G. (2011). In vivo evaluation of the cross-genotype neutralizing activity of polyclonal antibodies against hepatitis C virus. *Hepatology*, 53(3), 755-762.
- 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(6), 1761-1768.

- Meuleman, P., Libbrecht, L., De Vos, R., de Hemptinne, B., Gevaert, K., Vandekerckhove, J., ... & Leroux-Roels, G. (2005). Morphological and biochemical characterization of a human liver in a uPA-SCID mouse chimera. *Hepatology*, 41(4), 847-856.
- Meuleman, P., Libbrecht, L., Wieland, S., De Vos, R., Habib, N., Kramvis, A., ... & Leroux-Roels, G. (2006). Immune suppression uncovers endogenous cytopathic effects of the hepatitis B virus. *Journal of virology*, 80(6), 2797-2807.
- Meunier, J. C., Russell, R. S., Engle, R. E., Faulk, K. N., Purcell, R. H., & Emerson, S. U. (2008). Apolipoprotein c1 association with hepatitis C virus. *Journal of virology*, 82(19), 9647-9656.
- Missale, G., Bertoni, R., Lamonaca, V., Valli, A., Massari, M., Mori, C., ... & Ferrari, C. (1996). Different clinical behaviors of acute hepatitis C virus infection are associated with different vigor of the anti-viral cell-mediated immune response. *Journal of Clinical Investigation*, 98(3), 706.
- Miyanari, Y., Atsuzawa, K., Usuda, N., Watashi, K., Hishiki, T., Zayas, M., ... & Shimotohno, K. (2007). The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nature cell biology*, 9(9), 1089-1097.
- Modis, Y. (2014). Relating structure to evolution in class II viral membrane fusion proteins. *Current opinion in virology*, 5, 34-41.
- Mohd Hanafiah, K., Groeger, J., Flaxman, A. D., & Wiersma, S. T. (2013). Global epidemiology of hepatitis C virus infection: New estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. *Hepatology*, 57(4), 1333-1342.
- Molina, S., Castet, V., Pichard-Garcia, L., Wychowski, C., Meurs, E., Pascussi, J. M., ... & Dubuisson, J. (2008). Serum-derived hepatitis C virus infection of primary human hepatocytes is tetraspanin CD81 dependent. *Journal of virology*, 82(1), 569-574.
- Monazahian, M., Böhme, I., Bonk, S., Koch, A., Scholz, C., Grethe, S., & Thomssen, R. (1999). Low density lipoprotein receptor as a candidate receptor for hepatitis C virus. *Journal of medical virology*, 57(3), 223-229.
- Montenegro, L., De Michina, A., Misciagna, G., Guerra, V., & Di Leo, A. (2013). Virus C hepatitis and type 2 diabetes: a cohort study in southern Italy. *The American journal of gastroenterology*, 108(7), 1108-1111.
- Moradpour, D., & Blum, H. E. (2005). Pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *European journal of gastroenterology & hepatology*, 17(5), 477-483.
- Moradpour, D., & Penin, F. (2013). Hepatitis C virus proteins: from structure to function. In *Hepatitis C Virus: From Molecular Virology to Antiviral Therapy* (pp. 113-142). Springer Berlin Heidelberg.
- Moradpour, D., Brass, V., Bieck, E., Friebe, P., Gosert, R., Blum, H. E., ... & Lohmann, V. (2004). Membrane association of the RNA-dependent RNA polymerase is essential for hepatitis C virus RNA replication. *Journal of virology*, 78(23), 13278-13284.
- Moradpour, D., Englert, C., Wakita, T., & Wands, J. R. (1996). Characterization of cell lines allowing tightly regulated expression of hepatitis C virus core protein. *Virology*, 222(1), 51-63.
- Moradpour, D., Penin, F., & Rice, C. M. (2007). Replication of hepatitis C virus. *Nature Reviews Microbiology*, 5(6), 453-463.

- Moriishi, K., & Matsuura, Y. (2012). Exploitation of lipid components by viral and host proteins for hepatitis C virus infection. *Receptor usage and pathogenesis in acute and chronic viral infection*, 3(54), 43.
- Morikawa, K., Zhao, Z., Miyamoto, M., Murayama, A., Akazawa, D., Tanabe, J., ... & Wakita, T. (2007). The roles of CD81 and glycosaminoglycans in the adsorption and uptake of infectious HCV particles. *Journal of medical virology*, 79(6), 714-723.
- Moriya, K., Yotsuyanagi, H., Shintani, Y., Fujie, H., Ishibashi, K., Matsuura, Y., ... & Koike, K. (1997). Hepatitis C virus core protein induces hepatic steatosis in transgenic mice. *Journal of General Virology*, 78(7), 1527-1531.
- Morota, K., Fujinami, R., Kinukawa, H., Machida, T., Ohno, K., Saegusa, H., & Takeda, K. (2009). A new sensitive and automated chemiluminescent microparticle immunoassay for quantitative determination of hepatitis C virus core antigen. *Journal of virological methods*, 157(1), 8-14.
- Mousseau, G., Kota, S., Takahashi, V., Frick, D. N., & Strosberg, A. D. (2011). Dimerization-driven interaction of hepatitis C virus core protein with NS3 helicase. *Journal of General Virology*, 92(1), 101-111.
- Murayama, A., Weng, L., Date, T., Akazawa, D., Tian, X., Suzuki, T., ... & Toyoda, T. (2010). RNA polymerase activity and specific RNA structure are required for efficient HCV replication in cultured cells. *PLoS Pathog*, 6(4), e1000885.
- Murphy, D. G., Willems, B., Deschênes, M., Hilzenrat, N., Mousseau, R., & Sabbah, S. (2007). Use of sequence analysis of the NS5B region for routine genotyping of hepatitis C virus with reference to C/E1 and 5' untranslated region sequences. *Journal of clinical microbiology*, 45(4), 1102-1112.
- Murray, C. L., Jones, C. T., & Rice, C. M. (2008). Architects of assembly: roles of Flaviviridae non-structural proteins in virion morphogenesis. *Nature reviews microbiology*, 6(9), 699-708.
- Nahmias, Y., Goldwasser, J., Casali, M., van Poll, D., Wakita, T., Chung, R. T., & Yarmush, M. L. (2008). Apolipoprotein B-dependent hepatitis C virus secretion is inhibited by the grapefruit flavonoid naringenin. *Hepatology*, 47(5), 1437-1445.

N

- Nakai, K., Okamoto, T., Kimura-Someya, T., Ishii, K., Lim, C. K., Tani, H., ... & Miyamura, T. (2006). Oligomerization of hepatitis C virus core protein is crucial for interaction with the cytoplasmic domain of E1 envelope protein. *Journal of virology*, 80(22), 11265-11273.
- Neufeldt, C. J., Joyce, M. A., Levin, A., Steenbergen, R. H., Pang, D., Shields, J., ... & Wozniak, R. W. (2013). Hepatitis C virus-induced cytoplasmic organelles use the nuclear transport machinery to establish an environment conducive to virus replication. *PLoS Pathog*, 9(10), e1003744.
- Neumann-Haefelin, C., Blum, H. E., Chisari, F. V., & Thimme, R. (2005). T cell response in hepatitis C virus infection. *Journal of Clinical Virology*, 32(2), 75-85.
- Neumann, A. U., Lam, N. P., Dahari, H., Gretch, D. R., Wiley, T. E., Layden, T. J., & Perelson, A. S. (1998). Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon- α therapy. *Science*, 282(5386), 103-107.

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(1), 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(5), 2418-2428.

Nieva, J. L., Madan, V., & Carrasco, L. (2012). Viroporins: structure and biological functions. *Nature Reviews Microbiology*, 10(8), 563-574.

O

Ohara, E., Hiraga, N., Imamura, M., Iwao, E., Kamiya, N., Yamada, I., ... & Kawaoka, T. (2011). Elimination of hepatitis C virus by short term NS3-4A and NS5B inhibitor combination therapy in human hepatocyte chimeric mice. *Journal of hepatology*, 54(5), 872-878.

Ortega-Prieto, A. M., & Dorner, M. (2016). The expanding toolbox for hepatitis C virus research. *Journal of viral hepatitis*.

Osburn, W. O., Fisher, B. E., Dowd, K. A., Urban, G., Liu, L., Ray, S. C., ... & Cox, A. L. (2010). Spontaneous control of primary hepatitis C virus infection and immunity against persistent reinfection. *Gastroenterology*, 138(1), 315-324.

Osburn, W. O., Snider, A. E., Wells, B. L., Latanich, R., Bailey, J. R., Thomas, D. L., ... & Ray, S. C. (2014). Clearance of hepatitis C infection is associated with the early appearance of broad neutralizing antibody responses. *Hepatology*, 59(6), 2140-2151.

Osinusi, A., Meissner, E. G., Lee, Y. J., Bon, D., Heytens, L., Nelson, A., ... & Herrmann, E. (2013). Sofosbuvir and ribavirin for hepatitis C genotype 1 in patients with unfavorable treatment characteristics: a randomized clinical trial. *Jama*, 310(8), 804-811.

Owen, D. M., Huang, H., Ye, J., & Gale, M. (2009). Apolipoprotein E on hepatitis C virion facilitates infection through interaction with low-density lipoprotein receptor. *Virology*, 394(1), 99-108.

Owsianka, A. M., Timms, J. M., Tarr, A. W., Brown, R. J., Hickling, T. P., Szejek, A., ... & 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(17), 8695-8704.

P

Pachiadakis, I., Pollara, G., Chain, B. M., & Naoumov, N. V. (2005). Is hepatitis C virus infection of dendritic cells a mechanism facilitating viral persistence?. *The Lancet infectious diseases*, 5(5), 296-304.

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. *The EMBO Journal*, 21(5), 1168-1176.

- Patton, H. M., Patel, K., Behling, C., Bylund, D., Blatt, L. M., Vallée, M., ... & McHutchison, J. G. (2004). The impact of steatosis on disease progression and early and sustained treatment response in chronic hepatitis C patients. *Journal of hepatology*, 40(3), 484-490.
- Paul, D., Hoppe, S., Saher, G., Krijnse-Locker, J., & Bartenschlager, R. (2013). Morphological and biochemical characterization of the membranous hepatitis C virus replication compartment. *Journal of virology*, 87(19), 10612-10627.
- Pawlotsky, J. M. (2002). Use and interpretation of virological tests for hepatitis C. *Hepatology*, 36(S1).
- Pawlotsky, J. M. (2003). The nature of interferon- α resistance in hepatitis C virus infection. *Current opinion in infectious diseases*, 16(6), 587-592.
- Pawlotsky, J. M., Dahari, H., Neumann, A. U., Hezode, C., Germanidis, G., Lonjon, I., ... & Dhumeaux, D. (2004). Antiviral action of ribavirin in chronic hepatitis C. *Gastroenterology*, 126(3), 703-714.
- Pawlotsky, J. M., Najera, I., & Jacobson, I. (2012). Resistance to mericitabine, a nucleoside analogue inhibitor of HCV RNA-dependent RNA polymerase. *Antivir Ther*, 17(3), 411-23.
- Pawlotsky, J. M., Prescott, L., Simmonds, P., Pellet, C., Laurent-Puig, P., Labonne, C., ... & Etienne, J. P. (1997). Serological determination of hepatitis C virus genotype: comparison with a standardized genotyping assay. *Journal of clinical microbiology*, 35(7), 1734-1739.
- Peng, B., Yu, M., Xu, S., Lee, Y. J., Tian, Y., Yang, H., ... & Cheng, G. (2013). Development of robust hepatitis C virus genotype 4 subgenomic replicons. *Gastroenterology*, 144(1), 59-61.
- Pérez-Berná, A. J., Moreno, M. R., Guillén, J., Bernabeu, A., & Villalaín, J. (2006). The membrane-active regions of the hepatitis C virus E1 and E2 envelope glycoproteins. *Biochemistry*, 45(11), 3755-3768.
- Pérez-Berná, A. J., Pabst, G., Laggner, P., & Villalaín, J. (2009). Biophysical characterization of the fusogenic region of HCV envelope glycoprotein E1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1788(10), 2183-2193.
- Perin, P. M., Haid, S., Brown, R. J., Doerrbecker, J., Schulze, K., Zeilinger, C., ... & Baktash, Y. M. (2016). Flunarizine prevents hepatitis C virus membrane fusion in a genotype-dependent manner by targeting the potential fusion peptide within E1. *Hepatology*, 63(1), 49-62.
- Perotti, M., Mancini, N., Diotti, R. A., Tarr, A. W., Ball, J. K., Owsianka, A., ... & Burioni, R. (2008). Identification of a broadly cross-reacting and neutralizing human monoclonal antibody directed against the hepatitis C virus E2 protein. *Journal of virology*, 82(2), 1047-1052.
- Persing, D. H., & Landry, M. L. (1989). In vitro amplification techniques for the detection of nucleic acids: new tools for the diagnostic laboratory. *The Yale journal of biology and medicine*, 62(2), 159.
- Pestka, J. M., Zeisel, M. B., Bläser, E., Schürmann, P., Bartosch, B., Cosset, F. L., ... & Rispeter, K. (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(14), 6025-6030.
- Phan, T., Kohlway, A., Dimberu, P., Pyle, A. M., & Lindenbach, B. D. (2011). The acidic domain of hepatitis C virus NS4A contributes to RNA replication and virus particle assembly. *Journal of virology*, 85(3), 1193-1204.

- Pietschmann, T., Kaul, A., Koutsoudakis, G., Shavinskaya, A., Kallis, S., Steinmann, E., ... & Bartenschlager, R. (2006). Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(19), 7408-7413.
- Pietschmann, T., Lohmann, V., Kaul, A., Krieger, N., Rinck, G., Rutter, G., ... & Bartenschlager, R. (2002). Persistent and transient replication of full-length hepatitis C virus genomes in cell culture. *Journal of virology*, 76(8), 4008-4021.
- Pietschmann, T., Zayas, M., Meuleman, P., Long, G., Appel, N., Koutsoudakis, G., ... & Bartenschlager, R. (2009). Production of infectious genotype 1b virus particles in cell culture and impairment by replication enhancing mutations. *PLoS Pathog*, 5(6), e1000475.
- Pileri, P., Uematsu, Y., Campagnoli, S., Galli, G., Falugi, F., Petracca, R., ... & Abrignani, S. (1998). Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science*, 282(5390), 938-941.
- Piver, E., Boyer, A., Gaillard, J., Bull, A., Beaumont, E., Roingeard, P., & Meunier, J. C. (2016). Ultrastructural organisation of HCV from the bloodstream of infected patients revealed by electron microscopy after specific immunocapture. *Gut*, gutjnl-2016.
- Ploen, D., Hafirassou, M. L., Himmelsbach, K., Sauter, D., Biniousek, M. L., Weiss, T. S., ... & Hildt, E. (2013). TIP47 plays a crucial role in the life cycle of hepatitis C virus. *Journal of hepatology*, 58(6), 1081-1088.
- Ploss, A., & Evans, M. J. (2012). Hepatitis C virus host cell entry. *Current opinion in virology*, 2(1), 14-19.
- 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(7231), 882-886.
- Ploss, A., Khetani, S. R., Jones, C. T., Syder, A. J., Trehan, K., Gaysinskaya, V. A., ... & Bhatia, S. N. (2010). Persistent hepatitis C virus infection in microscale primary human hepatocyte cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(7), 3141-3145.
- Podevin, P., Carpentier, A., Pène, V., Aoudjehane, L., Carrière, M., Zaïdi, S., ... & Dreux, M. (2010). Production of infectious hepatitis C virus in primary cultures of human adult hepatocytes. *Gastroenterology*, 139(4), 1355-1364.
- Pöhlmann, S., Zhang, J., Baribaud, F., Chen, Z., Leslie, G. J., Lin, G., ... & McKeating, J. A. (2003). Hepatitis C virus glycoproteins interact with DC-SIGN and DC-SIGNR. *Journal of virology*, 77(7), 4070-4080.
- Pol, S., Ghalib, R. H., Rustgi, V. K., Martorell, C., Everson, G. T., Tatum, H. A., ... & Bräu, N. (2012). Daclatasvir for previously untreated chronic hepatitis C genotype-1 infection: a randomised, parallel-group, double-blind, placebo-controlled, dose-finding, phase 2a trial. *The Lancet infectious diseases*, 12(9), 671-677.
- Ponziani, F. R., Mangiola, F., Binda, C., Zocco, M. A., Siciliano, M., Grieco, A., ... & Gasbarrini, A. (2017). Future of liver disease in the era of direct acting antivirals for the treatment of hepatitis C. *World journal of hepatology*, 9(7), 352. (HCV Guidance: Recommendations for Testing, Managing, and Treating Hepatitis C. Available from: <http://www.hcvguidelines.org>.)

- Popescu, C. I., Callens, N., Trinel, D., Roingeard, P., Moradpour, D., Descamps, V., ... & Dubuisson, J. (2011). NS2 protein of hepatitis C virus interacts with structural and non-structural proteins towards virus assembly. *PLoS Pathog*, 7(2), e1001278.
- Potter, J. A., Owsianka, A. M., Jeffery, N., Matthews, D. J., Keck, Z. Y., Lau, P., ... & Patel, A. H. (2012). Toward a hepatitis C virus vaccine: the structural basis of hepatitis C virus neutralization by AP33, a broadly neutralizing antibody. *Journal of virology*, 86(23), 12923-12932.
- Poordad, F., McCone Jr, J., Bacon, B. R., Bruno, S., Manns, M. P., Sulkowski, M. S., ... & DiNubile, M. J. (2011). Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 infection. *New England Journal of Medicine*, 364(13), 1195-1206.
- Poynard, T., Ratziu, V., McHutchison, J., Manns, M., Goodman, Z., Zeuzem, S., ... & Albrecht, J. (2003). Effect of treatment with peginterferon or interferon alfa-2b and ribavirin on steatosis in patients infected with hepatitis C. *Hepatology*, 38(1), 75-85.
- Premkumar, A., Wilson, L., Ewart, G. D., & Gage, P. W. (2004). Cation-selective ion channels formed by p7 of hepatitis C virus are blocked by hexamethylene amiloride. *FEBS letters*, 557(1-3), 99-103.
- Prentoe, J., Jensen, T. B., Meuleman, P., Serre, S. B., Scheel, T. K., Leroux-Roels, G., ... & Bukh, J. (2011). Hypervariable region 1 differentially impacts viability of hepatitis C virus strains of genotypes 1 to 6 and impairs virus neutralization. *Journal of virology*, 85(5), 2224-2234.
- Prentoe, J., Serre, S. B., Ramirez, S., Nicosia, A., Gottwein, J. M., & Bukh, J. (2014). Hypervariable region 1 deletion and required adaptive envelope mutations confer decreased dependency on scavenger receptor class B type I and low-density lipoprotein receptor for hepatitis C virus. *Journal of virology*, 88(3), 1725-1739.
- Raghuraman, S., Park, H., Osburn, W. O., Winkelstein, E., Edlin, B. R., & Rehermann, B. (2012). Spontaneous clearance of chronic hepatitis C virus infection is associated with appearance of neutralizing antibodies and reversal of T-cell exhaustion. *Journal of Infectious Diseases*, 205(5), 763-771.
- Ramirez, S., Li, Y. P., Jensen, S. B., Pedersen, J., Gottwein, J. M., & Bukh, J. (2014). Highly efficient infectious cell culture of three hepatitis C virus genotype 2b strains and sensitivity to lead protease, nonstructural protein 5A, and polymerase inhibitors. *Hepatology*, 59(2), 395-407.
- Ramirez, S., Mikkelsen, L. S., Gottwein, J. M., & Bukh, J. (2016). Robust HCV genotype 3a infectious cell culture system permits identification of escape variants with resistance to sofosbuvir. *Gastroenterology*, 151(5), 973-985.
- Rehermann, B. (2009). Hepatitis C virus versus innate and adaptive immune responses: a tale of coevolution and coexistence. *The Journal of clinical investigation*, 119(7), 1745-1754.
- Reiss, S., Harak, C., Romero-Brey, I., Radujkovic, D., Klein, R., Ruggieri, A., ... & Lohmann, V. (2013). The lipid kinase phosphatidylinositol-4 kinase III alpha regulates the phosphorylation status of hepatitis C virus NS5A. *PLoS Pathog*, 9(5), e1003359.
- Reiss, S., Rebhan, I., Backes, P., Romero-Brey, I., Erfle, H., Matula, P., ... & Longerich, T. (2011). Recruitment and activation of a lipid kinase by hepatitis C virus NS5A is essential for integrity of the membranous replication compartment. *Cell host & microbe*, 9(1), 32-45.
- Rey, F. A., Heinz, F. X., Mandl, C., Kunz, C., & Harrison, S. C. (1995). The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 angstrom resolution. *Nature*, 375(6529), 291.

- Rhainds, D., & Brissette, L. (2004). The role of scavenger receptor class B type I (SR-BI) in lipid trafficking: defining the rules for lipid traders. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 36(1), 39-77.
- Roberts, E. A., & Yeung, L. (2002). Maternal-infant transmission of hepatitis C virus infection. *Hepatology*, 36(5B).
- Roche, S., & Gaudin, Y. (2002). Characterization of the equilibrium between the native and fusion-inactive conformation of rabies virus glycoprotein indicates that the fusion complex is made of several trimers. *Virology*, 297(1), 128-135.
- Roche, S., Bressanelli, S., Rey, F. A., & Gaudin, Y. (2006). Crystal structure of the low-pH form of the vesicular stomatitis virus glycoprotein G. *Science*, 313(5784), 187-191.
- Roelandt, P., Obeid, S., Paeshuyse, J., Vanhove, J., Van Lommel, A., Nahmias, Y., ... & Verfaillie, C. M. (2012). Human pluripotent stem cell-derived hepatocytes support complete replication of hepatitis C virus. *Journal of hepatology*, 57(2), 246-251.
- Romero-Brey, I., & Bartenschlager, R. (2014). Membranous replication factories induced by plus-strand RNA viruses. *Viruses*, 6(7), 2826-2857.
- Romero-Brey, I., Merz, A., Chiramel, A., Lee, J. Y., Chlanda, P., Haselman, U., ... & Walther, P. (2012). Three-dimensional architecture and biogenesis of membrane structures associated with hepatitis C virus replication. *PLoS Pathog*, 8(12), e1003056.
- Roohvand, F., & Kossari, N. (2012). Advances in hepatitis C virus vaccines, part two: advances in hepatitis C virus vaccine formulations and modalities. *Expert opinion on therapeutic patents*, 22(4), 391-415.
- Roohvand, F., Maillard, P., Lavergne, J. P., Boulant, S., Walic, M., Andréo, U., ... & Budkowska, A. (2009). Initiation of Hepatitis C Virus Infection Requires the Dynamic Microtubule Network ROLE OF THE VIRAL NUCLEOCAPSID PROTEIN. *Journal of Biological Chemistry*, 284(20), 13778-13791.
- Roudot-Thoraval, F. (2002). Épidémiologie de l'hépatite C. *médecine/sciences*, 18(3), 315-324.
- Rouillé, Y., Helle, F., Delgrange, D., Roingard, P., Voisset, C., Blanchard, E., ... & Wakita, T. (2006). Subcellular localization of hepatitis C virus structural proteins in a cell culture system that efficiently replicates the virus. *Journal of virology*, 80(6), 2832-2841.
- Russell, R. S., Kawaguchi, K., Meunier, J. C., Takikawa, S., Faulk, K., Bukh, J., ... & 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. *Journal of viral hepatitis*, 16(9), 621-632.

S

- Saalau-Bethell, S. M., Woodhead, A. J., Chessari, G., Carr, M. G., Coyle, J., Graham, B., ... & Richardson, C. J. (2012). Discovery of an allosteric mechanism for the regulation of HCV NS3 protein function. *Nature chemical biology*, 8(11), 920-925.

- Sabo, M. C., Luca, V. C., Prentoe, J., Hopcraft, S. E., Blight, K. J., Yi, M., ... & Fremont, D. H. (2011). Neutralizing monoclonal antibodies against hepatitis C virus E2 protein bind discontinuous epitopes and inhibit infection at a postattachment step. *Journal of virology*, 85(14), 7005-7019.
- Sacci, J. B., Alam, U., Douglas, D., Lewis, J., Tyrrell, D. L. J., Azad, A. F., & Kneteman, N. M. (2006). Plasmodium falciparum infection and exoerythrocytic development in mice with chimeric human livers. *International journal for parasitology*, 36(3), 353-360.
- Saeed, M., Andreo, U., Chung, H. Y., Espiritu, C., Branch, A. D., Silva, J. M., & Rice, C. M. (2015). SEC14L2 enables pan-genotype HCV replication in cell culture. *Nature*, 524(7566), 471-475.
- Saeed, M., Scheel, T. K., Gottwein, J. M., Marukian, S., Dustin, L. B., Bukh, J., & Rice, C. M. (2012). Efficient replication of genotype 3a and 4a HCV replicons in human hepatoma cells. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, AAC-01256.
- Sainz Jr, B., Barretto, N., Martin, D. N., Hiraga, N., Imamura, M., Hussain, S., ... & Uprichard, S. L. (2012). Identification of the Niemann-Pick C1-like 1 cholesterol absorption receptor as a new hepatitis C virus entry factor. *Nature medicine*, 18(2), 281-285.
- Saito, I., Miyamura, T., Ohbayashi, A., Harada, H., Katayama, T., Kikuchi, S., ... & Ohta, Y. (1990). Hepatitis C virus infection is associated with the development of hepatocellular carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(17), 6547-6549.
- Sakai, A., Claire, M. S., Faulk, K., Govindarajan, S., 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(20), 11646-11651.
- Salloum, S., Wang, H., Ferguson, C., Parton, R. G., & Tai, A. W. (2013). Rab18 binds to hepatitis C virus NS5A and promotes interaction between sites of viral replication and lipid droplets. *PLoS Pathog*, 9(8), e1003513.
- Saludes, V., González, V., Planas, R., Matas, L., Ausina, V., & Martró, E. (2014). Tools for the diagnosis of hepatitis C virus infection and hepatic fibrosis staging. *World J Gastroenterol*, 20(13), 3431-42.
- Sandgren, E. P., Palmiter, R. D., Heckel, J. L., Daugherty, C. C., Brinster, R. L., & Degen, J. L. (1991). Complete hepatic regeneration after somatic deletion of an albumin-plasminogen activator transgene. *Cell*, 66(2), 245-256.
- Sautto, G., Tarr, A. W., Mancini, N., & Clementi, M. (2013). Structural and antigenic definition of hepatitis C virus E2 glycoprotein epitopes targeted by monoclonal antibodies. *Clinical and Developmental Immunology*, 2013.
- Scarselli, E., Ansuini, H., Cerino, R., Roccasecca, R. M., Acali, S., Filocamo, G., ... & Vitelli, A. (2002). The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *The EMBO journal*, 21(19), 5017-5025.
- Scarselli, E., Ansuini, H., Cerino, R., Roccasecca, R. M., Acali, S., Filocamo, G., ... & Vitelli, A. (2002). The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *The EMBO journal*, 21(19), 5017-5025.
- Scheel, T. K., & Rice, C. M. (2013). Understanding the hepatitis C virus life cycle paves the way for highly effective therapies. *Nature medicine*, 19(7), 837-849.

- Scheel, T. K., Gottwein, J. M., Jensen, T. B., Prentoe, J. C., Hoegh, A. M., Alter, H. J., ... & Bukh, J. (2008). Development of JFH1-based cell culture systems for hepatitis C virus genotype 4a and evidence for cross-genotype neutralization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(3), 997-1002.
- Schneider, M. D., & Sarrazin, C. (2014). Antiviral therapy of hepatitis C in 2014: do we need resistance testing?. *Antiviral research*, 105, 64-71.
- Schneider, M. R., & Wolf, E. (2009). The epidermal growth factor receptor ligands at a glance. *Journal of cellular physiology*, 218(3), 460-466.
- Schwer, B., Ren, S., Pietschmann, T., Kartenbeck, J., Kaehlcke, K., Bartenschlager, R., ... & Ott, M. (2004). Targeting of hepatitis C virus core protein to mitochondria through a novel C-terminal localization motif. *Journal of virology*, 78(15), 7958-7968.
- Seeley, R., Stephens, T., Tate, P. (2003) Anatomy and physiology, 6th edn. *McGraw-Hill Companies Inc*, New York.
- 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(35), 30361-30376.
- Shi, Q., Jiang, J., & Luo, G. (2013). Syndecan-1 serves as the major receptor for attachment of hepatitis C virus to the surfaces of hepatocytes. *Journal of virology*, 87(12), 6866-6875.
- Shiffman, M. L., Ferreira-Gonzalez, A., Reddy, K. R., Sterling, R. K., Luketic, V. A., Stravitz, R. T., ... & Schiff, E. R. (2003). Comparison of three commercially available assays for HCV RNA using the international unit standard: implications for management of patients with chronic hepatitis C virus infection in clinical practice. *The American journal of gastroenterology*, 98(5), 1159-1166.
- Shin, E. C., Park, S. H., DeMino, M., Nascimbeni, M., Mihalik, K., Major, M., ... & Rehermann, B. (2011). Delayed induction, not impaired recruitment, of specific CD8+ T cells causes the late onset of acute hepatitis C. *Gastroenterology*, 141(2), 686-695.
- Shirasago, Y., Shimizu, Y., Tanida, I., Suzuki, T., Suzuki, R., Sugiyama, K., ... & Fukasawa, M. (2016). Occludin-knockout human hepatic huh7. 5.1-8-derived cells are completely resistant to hepatitis C virus infection. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 39(5), 839-848.
- Shulla, A., & Randall, G. (2012). Hepatitis C virus—host interactions, replication, and viral assembly. *Current opinion in virology*, 2(6), 725-732.
- Silverman, R. H. (2007). Viral encounters with 2', 5'-oligoadenylate synthetase and RNase L during the interferon antiviral response. *Journal of virology*, 81(23), 12720-12729.
- Simmonds, P. (2004). Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus—15 years on. *Journal of General Virology*, 85(11), 3173-3188.
- Simmonds, P. (2013). The origin of hepatitis C virus. In *Hepatitis C Virus: From Molecular Virology to Antiviral Therapy* (pp. 1-15). Springer Berlin Heidelberg.
- Simmonds, P., Holmes, E. C., Cha, T. A., Chan, S. W., McOmish, F., Irvine, B., ... & Urdea, M. S. (1993). Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *Journal of general virology*, 74(11), 2391-2399.

- Skehel, J. J., & Wiley, D. C. (2000). Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annual review of biochemistry*, 69(1), 531-569.
- Smith, D. B., Bukh, J., Kuiken, C., Muerhoff, A. S., Rice, C. M., Stapleton, J. T., & Simmonds, P. (2014). Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology*, 59(1), 318-327.
- Sourisseau, M., Michta, M. L., Zony, C., Israelow, B., Hopcraft, S. E., Narbus, C. M., ... & Evans, M. J. (2013). Temporal analysis of hepatitis C virus cell entry with occludin directed blocking antibodies. *PLoS Pathog*, 9(3), e1003244.
- Spadaccini, R., D'Errico, G., D'Alessio, V., Notomista, E., Bianchi, A., Merola, M., & Picone, D. (2010). Structural characterization of the transmembrane proximal region of the hepatitis C virus E1 glycoprotein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1798(3), 344-353.
- Stapleford, K. A., & Lindenbach, B. D. (2011). Hepatitis C virus NS2 coordinates virus particle assembly through physical interactions with the E1-E2 glycoprotein and NS3-NS4A enzyme complexes. *Journal of virology*, 85(4), 1706-1717.
- Steinmann, E., & Pietschmann, T. (2010). Hepatitis C virus p7—a viroporin crucial for virus assembly and an emerging target for antiviral therapy. *Viruses*, 2(9), 2078-2095.
- Steinmann, E., & Pietschmann, T. (2013). Cell culture systems for hepatitis C virus. In *Hepatitis C Virus: From Molecular Virology to Antiviral Therapy* (pp. 17-48). Springer Berlin Heidelberg.
- Steinmann, E., Doerrbecker, J., Friesland, M., Riebesehl, N., Ginkel, C., Hillung, J., ... & Pietschmann, T. (2013). Characterization of hepatitis C virus intra-and intergenotypic chimeras reveals a role of the glycoproteins in virus envelopment. *Journal of virology*, 87(24), 13297-13306.
- 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(7), e103.
- Stiasny, K., & Heinz, F. X. (2006). Flavivirus membrane fusion. *Journal of general virology*, 87(10), 2755-2766.
- Strickland, G. T. (2006). Liver disease in Egypt: hepatitis C superseded schistosomiasis as a result of iatrogenic and biological factors. *Hepatology*, 43(5), 915-922.
- Su, A. I., Pezacki, J. P., Wodicka, L., Brideau, A. D., Supekova, L., Thimme, R., ... & Chisari, F. V. (2002). Genomic analysis of the host response to hepatitis C virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(24), 15669-15674.
- Sulkowski, M. S., Gardiner, D. F., Rodriguez-Torres, M., Reddy, K. R., Hassanein, T., Jacobson, I., ... & Schwartz, H. (2014). Daclatasvir plus sofosbuvir for previously treated or untreated chronic HCV infection. *New England Journal of Medicine*, 370(3), 211-221.
- Sumpter, R., Loo, Y. M., Foy, E., Li, K., Yoneyama, M., Fujita, T., ... & Gale, 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(5), 2689-2699.

T

- Tahara, Y., & Shibata, S. (2016). Circadian rhythms of liver physiology and disease: experimental and clinical evidence. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*.
- Takaki, A., Wiese, M., Maertens, G., Depla, E., Seifert, U., Liebetrau, A., ... & 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(5), 578-582.
- Takeuchi, O., & Akira, S. (2009). Innate immunity to virus infection. *Immunological reviews*, 227(1), 75-86.
- Tamai, K., Shiina, M., Tanaka, N., Nakano, T., Yamamoto, A., Kondo, Y., ... & Ueno, Y. (2012). Regulation of hepatitis C virus secretion by the Hrs-dependent exosomal pathway. *Virology*, 422(2), 377-385.
- Targett-Adams, P., Boulant, S., & McLauchlan, J. (2008a). Visualization of double-stranded RNA in cells supporting hepatitis C virus RNA replication. *Journal of virology*, 82(5), 2182-2195.
- Targett-Adams, P., Hope, G., Boulant, S., & McLauchlan, J. (2008b). Maturation of hepatitis C virus core protein by signal peptide peptidase is required for virus production. *Journal of Biological Chemistry*, 283(24), 16850-16859.
- Tarr, A. W., Owsianka, A. M., Jayaraj, D., Brown, R. J., Hickling, T. P., Irving, W. L., ... & Ball, J. K. (2007). Determination of the human antibody response to the epitope defined by the hepatitis C virus-neutralizing monoclonal antibody AP33. *Journal of General Virology*, 88(11), 2991-3001.
- Tellinghuisen, T. L., Foss, K. L., & Treadaway, J. (2008). Regulation of hepatitis C virion production via phosphorylation of the NS5A protein. *PLoS Pathog*, 4(3), e1000032.
- Tesfaye, A., Stift, J., Maric, D., Cui, Q., Dienes, H. P., & Feinstone, S. M. (2013). Chimeric mouse model for the infection of hepatitis B and C viruses. *PloS one*, 8(10), e77298.
- Thi, V. L. D., Granier, C., Zeisel, M. B., Guérin, M., Mancip, J., Granio, O., ... & Cosset, F. L. (2012). Characterization of hepatitis C virus particle subpopulations reveals multiple usage of the scavenger receptor BI for entry steps. *Journal of Biological Chemistry*, 287(37), 31242-31257.
- Thimme, R., Bukh, J., Spangenberg, H. C., Wieland, S., Pemberton, J., Steiger, C., ... & Chisari, F. V. (2002). Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(24), 15661-15668.
- Thimme, R., Oldach, D., Chang, K. M., Steiger, C., Ray, S. C., & Chisari, F. V. (2001). Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *The Journal of experimental medicine*, 194(10), 1395-1406.
- Thomas, D. L. (2013). Global control of hepatitis C: where challenge meets opportunity. *Nature medicine*, 19(7), 850-858.
- Thompson, A. A., Zou, A., Yan, J., Duggal, R., Hao, W., Molina, D., ... & 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(5), 906-916.

Thomssen, R., Bonk, S., & Thiele, A. (1993). Density heterogeneities of hepatitis C virus in human sera due to the binding of β -lipoproteins and immunoglobulins. *Medical microbiology and immunology*, 182(6), 329-334.

Thomssen, R., Bonk, S., Propfe, C., Heermann, K. H., Köchel, H. G., & Uy, A. (1992). Association of hepatitis C virus in human sera with β -lipoprotein. *Medical microbiology and immunology*, 181(5), 293-300.

Timpe, J. M., & McKeating, J. A. (2008). Hepatitis C virus entry: possible targets for therapy. *Gut*, 57(12), 1728-1737.

Timpe, J. M., Stamataki, Z., Jennings, A., Hu, K., Farquhar, M. J., Harris, H. J., ... & McKeating, J. A. (2008). Hepatitis C virus cell-cell transmission in hepatoma cells in the presence of neutralizing antibodies. *Hepatology*, 47(1), 17-24.

Tong, Y., Zhu, Y., Xia, X., Liu, Y., Feng, Y., Hua, X., ... & Feitelson, M. A. (2011). Tupaia CD81, SR-BI, claudin-1, and occludin support hepatitis C virus infection. *Journal of virology*, 85(6), 2793-2802.

Tsai, S. L., Liaw, Y., Chen, M. H. C. Y., Huang, C. Y., & Kuo, G. C. (1997). Detection of type 2-like T-helper cells in hepatitis C virus infection: Implications for hepatitis C virus chronicity. *Hepatology*, 25(2), 449-458.

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(4), 1734-1741.

U

Ujino, S., Nishitsuji, H., Hishiki, T., Sugiyama, K., Takaku, H., & Shimotohno, K. (2016). Hepatitis C virus utilizes VLDLR as a novel entry pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(1), 188-193.

V

Van Itallie, C. M., & Anderson, J. M. (2006). Claudins and epithelial paracellular transport. *Annu. Rev. Physiol.*, 68, 403-429.

Vassilaki, N., Friebe, P., Meuleman, P., Kallis, S., Kaul, A., Paranhos-Baccalà, G., ... & 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(23), 11503-11515.

Vausselin, T., Calland, N., Belouzard, S., Descamps, V., Douam, F., Helle, F., ... & Fénéant, L. (2013). The antimalarial ferroquine is an inhibitor of hepatitis C virus. *Hepatology*, 58(1), 86-97.

Vercauteren, K., de Jong, Y. P., & Meuleman, P. (2014). HCV animal models and liver disease. *Journal of hepatology*, 61(1), S26-S33.

Vausselin, T., Séron, K., Lavie, M., Mesalam, A. A., Lemasson, M., Belouzard, S., ... & Foquet, L. (2016). Identification of a new benzimidazole derivative as an antiviral against hepatitis C virus. *Journal of Virology*, 90(19), 8422-8434.

- Vescovo, T., Refolo, G., Vitagliano, G., Fimia, G. M., & Piacentini, M. (2016). Molecular mechanisms of hepatitis C virus-induced hepatocellular carcinoma. *Clinical Microbiology and Infection*, 22(10), 853-861.
- Vieyres, G., Dubuisson, J., & Pietschmann, T. (2014). Incorporation of hepatitis C virus E1 and E2 glycoproteins: the keystones on a peculiar virion. *Viruses*, 6(3), 1149-1187.
- 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(19), 10159-10168.
- Vogt, D. A., Camus, G., Herker, E., Webster, B. R., Tsou, C. L., Greene, W. C., ... & Ott, M. (2013). Lipid droplet-binding protein TIP47 regulates hepatitis C Virus RNA replication through interaction with the viral NS5A protein. *PLoS Pathog*, 9(4), e1003302.
- Voisset, C., & Dubuisson, J. (2004). Functional hepatitis C virus envelope glycoproteins. *Biology of the Cell*, 96(6), 413-413.
- Voisset, C., Callens, N., Blanchard, E., De Beeck, A. O., 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(9), 7793-7799.
- Voisset, C., de Beeck, A. O., Horellou, P., Dreux, M., Gustot, T., Duverlie, G., ... & 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(9), 2577-2581.
- Von Hahn, T., Yoon, J. C., Alter, H., Rice, C. M., Rehermann, B., Balfe, P., & McKeating, J. A. (2007). Hepatitis C virus continuously escapes from neutralizing antibody and T-cell responses during chronic infection in vivo. *Gastroenterology*, 132(2), 667-678.
- von Schaewen, M., & Ploss, A. (2014). Murine models of hepatitis C: What can we look forward to?. *Antiviral research*, 104, 15-22.

W

- Wack, A., Soldaini, E., Tseng, C. T. K., Nuti, S., Klimpel, G. R., & Abrignani, S. (2001). Binding of the hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 provides a co-stimulatory signal for human T cells. *European journal of immunology*, 31(1), 166-175.
- Wahid, A., Helle, F., Descamps, V., Duverlie, G., Penin, F., & Dubuisson, J. (2013). Disulfide bonds in hepatitis C virus glycoprotein E1 control the assembly and entry functions of E2 glycoprotein. *Journal of virology*, 87(3), 1605-1617.
- Wakita, T., Pietschmann, T., Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., ... & Bartenschlager, R. (2005). Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nature medicine*, 11(7), 791-796.
- Walewski, J. L., Keller, T. R., Stump, D. D., & Branch, A. D. (2001). Evidence for a new hepatitis C virus antigen encoded in an overlapping reading frame. *Rna*, 7(5), 710-721.
- Walker, C. M., & Grakoui, A. (2015). Hepatitis C virus: why do we need a vaccine to prevent a curable persistent infection?. *Current opinion in immunology*, 35, 137-143.

- Wang, Y., Keck, Z. Y., & Fong, S. K. (2011). Neutralizing antibody response to hepatitis C virus. *Viruses*, 3(11), 2127-2145.
- Washburn, M. L., Bility, M. T., Zhang, L., Kovalev, G. I., Buntzman, A., Frelinger, J. A., ... & Su, L. (2011). A humanized mouse model to study hepatitis C virus infection, immune response, and liver disease. *Gastroenterology*, 140(4), 1334-1344.
- Webster, D. P., Klenerman, P., & Dusheiko, G. M. (2015). Hepatitis C. *Lancet* 385, 1124–35.
- Weinglass, A. B., Kohler, M., Schulte, U., Liu, J., Nketiah, E. O., Thomas, A., ... & Dai, K. (2008). Extracellular loop C of NPC1L1 is important for binding to ezetimibe. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(32), 11140-11145.
- Welbourn, S., Green, R., Gamache, I., Dandache, S., Lohmann, V., Bartenschlager, R., ... & Pause, A. (2005). Hepatitis C virus NS2/3 processing is required for NS3 stability and viral RNA replication. *Journal of Biological Chemistry*, 280(33), 29604-29611.
- Welsch, S., Müller, B., & Kräusslich, H. G. (2007). More than one door—budding of enveloped viruses through cellular membranes. *FEBS letters*, 581(11), 2089-2097.
- White, J. M., Delos, S. E., Brecher, M., & Schornberg, K. (2008). Structures and mechanisms of viral membrane fusion proteins: multiple variations on a common theme. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 43(3), 189-219.
- Wieland, S., Makowska, Z., Campana, B., Calabrese, D., Dill, M. T., Chung, J., ... & Heim, M. H. (2014). Simultaneous detection of hepatitis C virus and interferon stimulated gene expression in infected human liver. *Hepatology*, 59(6), 2121-2130.
- Wilkins, C., Woodward, J., Lau, D. T. Y., Barnes, A., Joyce, M., McFarlane, N., ... & Gale, M. (2013). IFITM1 is a tight junction protein that inhibits hepatitis C virus entry. *Hepatology*, 57(2), 461-469.
- Williamson, C. D., & Colberg-Poley, A. M. (2009). Access of viral proteins to mitochondria via mitochondria-associated membranes. *Reviews in medical virology*, 19(3), 147-164.
- Wilson, E. M., Bial, J., Tarlow, B., Bial, G., Jensen, B., Greiner, D. L., ... & Grompe, M. (2014). Extensive double humanization of both liver and hematopoiesis in FRGN mice. *Stem cell research*, 13(3), 404-412.
- Witteveldt, J., Evans, M. J., Bitzegeio, J., Koutsoudakis, G., Owsianka, A. M., Angus, A. G., ... & Patel, A. H. (2009). CD81 is dispensable for hepatitis C virus cell-to-cell transmission in hepatoma cells. *Journal of General Virology*, 90(1), 48-58.
- Wozniak, A. L., Griffin, S., Rowlands, D., Harris, M., Yi, M., Lemon, S. M., & Weinman, S. A. (2010). Intracellular proton conductance of the hepatitis C virus p7 protein and its contribution to infectious virus production. *PLoS Pathog*, 6(9), e1001087.
- Wünschmann, S., Medh, J. D., Klinzmann, D., Schmidt, W. N., & Stapleton, J. T. (2000). Characterization of hepatitis C virus (HCV) and HCV E2 interactions with CD81 and the low-density lipoprotein receptor. *Journal of virology*, 74(21), 10055-10062.

X

- Xiao, F., Fofana, I., Heydmann, L., Barth, H., Soulier, E., Habersetzer, F., ... & Baumert, T. F. (2014). Hepatitis C virus cell-cell transmission and resistance to direct-acting antiviral agents. *PLoS Pathog*, *10*(5), e1004128.
- Xie, Z. C., Riezu-Boj, J. I., Lasarte, J. J., Guillen, J., Su, J. H., Civeira, M. P., & Prieto, J. (1998). Transmission of hepatitis C virus infection to tree shrews. *Virology*, *244*(2), 513-520.
- Xu, X., Chen, H., Cao, X., & Ben, K. (2007). Efficient infection of tree shrew (*Tupaia belangeri*) with hepatitis C virus grown in cell culture or from patient plasma. *Journal of General Virology*, *88*(9), 2504-2512.
- Xu, Y., Martinez, P., Séron, K., Luo, G., Allain, F., Dubuisson, J., & Belouzard, S. (2015). Characterization of hepatitis C virus interaction with heparan sulfate proteoglycans. *Journal of virology*, *89*(7), 3846-3858.

Y

- Yamamoto, S., Fukuhara, T., Ono, C., Uemura, K., Kawachi, Y., Shiokawa, M., ... & Hiraga, N. (2016). Lipoprotein receptors redundantly participate in entry of hepatitis C virus. *PLoS Pathog*, *12*(5), e1005610.
- Yanagi, M., Claire, M. S., Emerson, S. U., Purcell, R. H., & Bukh, J. (1999). In vivo analysis of the 3' untranslated region of the hepatitis C virus after in vitro mutagenesis of an infectious cDNA clone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *96*(5), 2291-2295.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *94*(16), 8738-8743.
- Yang, D. R., & Zhu, H. Z. (2015). Hepatitis C virus and antiviral innate immunity: who wins at tug-of-war?. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, *21*(13), 3786.
- Yao, H., & Ye, J. (2008). Long chain acyl-CoA synthetase 3-mediated phosphatidylcholine synthesis is required for assembly of very low density lipoproteins in human hepatoma Huh7 cells. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(2), 849-854.
- Ye, J. (2007). Reliance of host cholesterol metabolic pathways for the life cycle of hepatitis C virus. *PLoS Pathog*, *3*(8), e108.
- Ye, J., Wang, C., Sumpter, R., Brown, M. S., Goldstein, J. L., & Gale, M. (2003). Disruption of hepatitis C virus RNA replication through inhibition of host protein geranylgeranylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(26), 15865-15870.
- Yi, M., & Lemon, S. M. (2003). 3' nontranslated RNA signals required for replication of hepatitis C virus RNA. *Journal of virology*, *77*(6), 3557-3568.
- Yi, M., & Lemon, S. M. (2004). Adaptive mutations producing efficient replication of genotype 1a hepatitis C virus RNA in normal Huh7 cells. *Journal of virology*, *78*(15), 7904-7915.

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(2), 629-638.

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 Pathog*, 5(5), e1000403.

Yoon, E. J., & Hu, K. Q. (2006). Hepatitis C virus (HCV) infection and hepatic steatosis. *Int J Med Sci*, 3(2), 53-6.

Yoshida, T., Takayama, K., Kondoh, M., Sakurai, F., Tani, H., Sakamoto, N., ... & Yagi, K. (2011). Use of human hepatocyte-like cells derived from induced pluripotent stem cells as a model for hepatocytes in hepatitis C virus infection. *Biochemical and biophysical research communications*, 416(1), 119-124.

Yu, M., Peng, B., Chan, K., Gong, R., Yang, H., Delaney, W., & Cheng, G. (2014). Robust and persistent replication of the genotype 6a hepatitis C virus replicon in cell culture. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 58(5), 2638-2646.

Z

Zahid, M. N., Turek, M., Xiao, F., Dao Thi, V. L., Guérin, M., Fofana, I., ... & Bankwitz, D. (2013). The postbinding activity of scavenger receptor class B type I mediates initiation of hepatitis C virus infection and viral dissemination. *Hepatology*, 57(2), 492-504.

Zazrin, H., Shaked, H., & Chill, J. H. (2014). Architecture of the hepatitis C virus E1 glycoprotein transmembrane domain studied by NMR. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1838(3), 784-792.

Zeuzem, S. (2008). Interferon-based therapy for chronic hepatitis C: current and future perspectives. *Nature clinical practice Gastroenterology & hepatology*, 5(11), 610-622.

Zeuzem, S., Buggisch, P., Agarwal, K., Marcellin, P., Sereni, D., Klinker, H., ... & Arterburn, S. (2012). The protease inhibitor, GS-9256, and non-nucleoside polymerase inhibitor tegobuvir alone, with ribavirin, or pegylated interferon plus ribavirin in hepatitis C. *Hepatology*, 55(3), 749-758.

Zhang, P., Wu, C. G., Mihalik, K., Virata-Theimer, M. L., Mei-ying, W. Y., Alter, H. J., & Feinstone, S. M. (2007). Hepatitis C virus epitope-specific neutralizing antibodies in Igs prepared from human plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(20), 8449-8454.

Zhao, X., Tang, Z. Y., Klumpp, B., Wolff-Vorbeck, G., Barth, H., Levy, S., ... & Baumert, T. F. (2002). Primary hepatocytes of *Tupaia belangeri* as a potential model for hepatitis C virus infection. *The Journal of clinical investigation*, 109(2), 221-232.

Zheng, A., Yuan, F., Li, Y., Zhu, F., Hou, P., Li, J., ... & Deng, H. (2007). Claudin-6 and claudin-9 function as additional coreceptors for hepatitis C virus. *Journal of virology*, 81(22), 12465-12471.

Zhong, J., Gastaminza, P., Cheng, G., Kapadia, S., Kato, T., Burton, D. R., ... & Chisari, F. V. (2005). Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(26), 9294-9299.

Zhong, W., Ferrari, E., Lesburg, C. A., Maag, D., Ghosh, S. K. B., Cameron, C. E., ... & Hong, Z. (2000a). Template/primer requirements and single nucleotide incorporation by hepatitis C virus nonstructural protein 5B polymerase. *Journal of virology*, 74(19), 9134-9143.

Zhong, W., Uss, A. S., Ferrari, E., Lau, J. Y., & Hong, Z. (2000b). De novo initiation of RNA synthesis by hepatitis C virus nonstructural protein 5B polymerase. *Journal of virology*, 74(4), 2017-2022.

Zingaretti, C., De Francesco, R., & Abrignani, S. (2014). Why is it so difficult to develop a hepatitis C virus preventive vaccine?. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(s5), 103-109.

Zona, L., Lupberger, J., Sidahmed-Adrar, N., Thumann, C., Harris, H. J., Barnes, A., ... & Durand, S. C. (2013). HRas signal transduction promotes hepatitis C virus cell entry by triggering assembly of the host tetraspanin receptor complex. *Cell host & microbe*, 13(3), 302-313.

