HAL
open science

Rôle des lipoprotéines associées au virus de l'hépatite C et des microtubules dans l'entrée du virus dans la cellule et l'établissement de l'infection

Marine Walic

To cite this version:

Marine Walic. Rôle des lipoprotéines associées au virus de l'hépatite C et des microtubules dans l'entrée du virus dans la cellule et l'établissement de l'infection. Virologie. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2010. Français. NNT : 2010PA066101 . tel-00814990

HAL Id: tel-00814990

https://theses.hal.science/tel-00814990

Submitted on 18 Apr 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Pierre & Marie Curie - Paris 6
15, rue de l'école de médecine
75270-PARIS Cedex 06

Ecole Doctorale B2M / B3MI
Bâtiment Lamarck – 35, rue Hélène Brion
75013 PARIS

Unité HEPACIVIRUS ET IMMUNITE INNEE
Institut Pasteur
28, rue du Docteur Roux
75015 PARIS

Thèse de Doctorat de l'Université Paris 6 "Pierre et Marie Curie"

Ecole Doctorale B2M – Biochimie et Biologie Moléculaire

Spécialité
Virologie Fondamentale

Présentée par
Marine WALIC

Pour obtenir le titre de Docteur de l'Université Paris 6

Sujet de la thèse

ROLE DES LIPOPROTEINES ASSOCIEES AU VIRUS DE L'HEPATITE C ET DES MICROTUBULES DANS L'ENTREE DU VIRUS DANS LA CELLULE ET L'ETABLISSEMENT DE L'INFECTION

Soutenue le 18 Février 2010, devant le jury composé de

Pr. Vincent Maréchal :	Président du jury
Pr. Patrice André :	Rapporteur
Pr. Philippe Roingeard :	Rapporteur
Dr. Thierry Huby :	Examinateur
Dr.Florence Colbère-Garapin :	Examinateur
Dr. Agata Budkowska :	Directeur de thèse

RESUME

L'hépatite C reste un problème majeur de santé publique. Malgré la mise au point d'un modèle de réplication du virus de l'hépatite C (VHC) *in vitro,* les mécanismes conduisant à l'infection restent encore mal connus. Le VHC est sécrété et circule dans le sérum associé à des lipoprotéines. L'importance des lipoprotéines pour le cycle viral nous a conduits à étudier le rôle de la lipoprotéine lipase (LPL), une enzyme lipolytique, dans l'infection de la cellule par le VHC.
Nous avons montré que la LPL potentialise l'attachement et l'internalisation du virus par un mécanisme similaire à la clearance hépatique des lipoprotéines. La LPL dimérique forme un pont entre les lipoprotéines associées au virus et les HSPG à la surface des cellules. Néanmoins son action conduit à une inhibition de l'infection par les souches virales JFH-1 et J6/JFH-1 produites en culture cellulaire et dans les hépatocytes humains greffés à des souris chimériques uPA-SCID.
L'analyse par ultracentrifugation en gradient d'iodixanol des virus produits *in vitro* et *in vivo* a montré la présence de deux populations virales : la première, de densité très faible, est beaucoup plus infectieuse que la seconde, de densité plus élevée. L'infection *in vitro* par ces deux populations virales est inhibée par la LPL. La LPL représente donc un nouvel inhibiteur de l'infection par le VHC.
Nous avons également démontré que la présence d'un réseau de microtubules intact et dynamique est cruciale pour l'entrée du VHC et les étapes post-fusion qui mènent à l'infection. Enfin, nous avons mis en évidence une interaction de la protéine de capside avec les tubulines α et β, conduisant à une augmentation de la polymérisation des microtubules. Ces observations suggèrent que le VHC pourrait utiliser les mécanismes de polymérisation des microtubules pour établir l'infection, et la protéine de capside jouer un rôle essentiel dans ce processus.
Les nouvelles approches antivirales pourraient donc cibler les éléments du cytosquelette et/ou des lipoprotéines associées aux particules virales.

ABSTRACT

Hepatitis C virus (HCV) infection remains a major health problem. Despite of the development of a cell culture system permitting HCV replication *in vitro,* the mechanisms leading to infection are still not well understood. HCV is secreted and circulates in the patient serum in association with lipoproteins. The importance of lipoproteins for the virus life cycle led us to investigate a role of lipoprotein lipase (LPL), a lipolytic enzyme, in the cell infection with HCV.
We showed that LPL increases virus attachment and internalisation by mechanisms similar to the hepatic uptake of lipoproteins. Dimeric LPL forms a bridge between virus-associated lipoproteins and HSPG at the cell surface. Nevertheless, LPL inhibits cell infection with two virus strains: JFH-1 and J6/JFH-1, produced either in cell culture, or in chimeric uPA-SCID mice with transplanted human hepatocytes.
Analyses of the viruses produced *in vitro* and *in vivo* in iodixanol gradients showed the presence of two virus populations banding at very low and higher density, the first population being much more infectious than the latter one. Cell infection with low and higher density viruses was inhibited by LPL. Thus, LPL represents a novel inhibitor of HCV infectivity.
We showed that the intact and dynamic microtubules are crucial for HCV cell entry and early post-fusion steps, leading to productive infection. In addition, we provided evidence that HCV core protein directly interacts with α/β tubulin, increasing polymerisation of microtubules. These observations suggest that HCV could use microtubule polymerisation mechanisms to establish infection, in which virus core protein might play an important role.
New anti-viral approaches may thus target the elements of the cytoskeleton and/or lipoproteins associated with virus particles.

« La science consiste à passer d'un étonnement à un autre. »
Aristote

« Savoir s'étonner à propos est le premier pas fait sur la route de la découverte. »
Louis Pasteur

A Mamy

Serrez vos grands-parents dans vos bras et dites : "Merci d'avoir fait ce que tu as fait pour que je puisse exister !"
Alex Haley

La vie n'a pas d'âge.
La vraie jeunesse ne s'use pas.
On a beau l'appeler souvenir,
On a beau dire qu'elle disparaît,
On a beau dire et vouloir dire que tout s'en va,
Tout ce qui est vrai reste là.
Quand la vérité est laide, c'est une bien fâcheuse histoire,
Quand la vérité est belle, rien ne ternit son miroir.
Les gens très âgés remontent en enfance
Et leur cœur bat
Là ou il n'y a pas d'autrefois.

Jacques Prévert

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr Agata Budkowska pour m'avoir accueillie dans son groupe et initiée au monde du virus de l'hépatite C. Merci de m'avoir encadrée durant ces années de thèse, d'avoir dirigé mon travail avec attention et optimisme, de m'avoir toujours poussée à dépasser mes limites : cela a parfois été dur mais toujours extrêmement formateur et, ensemble, nous avons réussi. Un immense merci également pour ta confiance sans laquelle je n'aurais sans doute jamais eu la chance, en tant qu'étudiante, de présenter mes résultats lors d'un prestigieux congrès international.

Je remercie également chaleureusement le Dr Eliane Meurs pour m'avoir accueillie au sein de son Unité, avoir appuyé mes demandes de financements, ainsi que pour ses conseils précieux durant ces trois années.

Je tiens à remercier le Pr Vincent Maréchal pour avoir accepté de présider mon jury de thèse ainsi que pour sa disponibilité, sa gentillesse et son immense soutien. Je remercie le Pr Patrice André et le Pr Philippe Roingeard pour avoir gentiment accepté de lire mon manuscrit, apporté leur avis sur ce travail et d'en être juges. Merci également aux Dr Thierry Huby et Dr Florence Colbère-Garapin pour avoir accepté de participer à mon jury de thèse en tant qu'examinateurs.

Un immense merci au Dr Patrick Maillard pour sa patience infinie en me formant depuis mon arrivée au laboratoire à quelques-unes des nombreuses techniques qu'il maitrise parfaitement. Merci pour les explications détaillées, l'aide apportée et pour le soutien, autant technique que moral, il m'a été précieux, surtout les derniers mois. Merci également d'avoir supporté, en tant que voisin de bureau, toutes mes « divagations philosophiques ». Pour que cela ne te manque pas trop, je le répète encore une fois : la vie est belle donc profitons-en au maximum !
Merci également au Dr Ursula Andréo pour sa disponibilité et sa patience lors de mon arrivée, ses conseils avisés avant de me « passer le bébé ». Un immense merci au Dr Farzin Roohvand pour son optimisme sans limite, sa devise "Don't worry, be happy" me suis maintenant partout, ainsi que pour son soutien permanent, sa gentillesse et ses nombreux conseils et coups de main à tout instant. Je remercie également Andrea Cerutti (l'accent du Sud, c'est du soleil dans le labo) et le Dr Olga Kalinina (avoir fait ta connaissance a été un plaisir, même si tu es restée peu de temps) pour leur gentillesse et leur soutien. Merci aussi à tous les membres de l'Unité HII, présents et passés : Stéphanie (pour moi un des piliers du labo), Noëlla (ta joie de vivre et ton slogan « Force et

Espoir » illuminent le labo), Damien (toujours présent, un réel soutien), Malek (because of our friendship, you gave me self-confidence and I'm now speaking fluent english), Myriam, Noémie, Emilie, Erwan, Marie : vous avez tous été présents à un moment ou à un autre en cas de besoin, que ce soit pour les coups durs ou pour de bonnes crises de fou rire ! Merci à Josiane pour sa patience et son aide précieuse dans les méandres du monde administratif.

Un énorme merci aux petites Vamps de l'étage Chantal et Momo, ainsi qu'à Katie, toujours présentes, toujours le mot qu'il faut quand il faut, et plus que tout, gardez à l'esprit que sans vous, les labos ne tourneraient plus, ce qui est malheureusement trop souvent oublié. Votre aide a été infiniment précieuse.

Merci à tous les membres du 3ème étage du bâtiment Lwoff, que ce soit pour leur aide et leur amitié : Yves Rivière et Florence Buseyne pour m'avoir initiée à la recherche en P3, Louise-Marie pour son soutien et nos conversations au détour d'un couloir, Monica, Valentina et Céline, Yann, Shirine et Delphine : tant de soirées et weekends au labo avec vous, de belles amitiés et une grande solidarité entre thésards.

Je tiens aussi à remercier toutes les personnes de Lwoff qui m'ont soutenue toutes ces années : Philippe, Sylviane, Bosco, Jocelyne, Simona, Manu, Isma, Greg, Minerva, Myrtille, Monica, Marie, Rodolphe, Florence et tous les autres.

Merci à tous ceux avec qui j'ai eu la chance de collaborer : Emmanuelle Perret de la Plateforme d'Imagerie, qui m'a ouvert les portes du monde de la microscopie, les Dr Patrick Maurel et Dr Claire Gondeau à Montpellier, pour m'avoir initiée aux mystères de la culture d'hépatocytes humains primaires.

Je ne saurais suffisamment remercier le Dr Christophe Préhaud, Françoise Mégret, le Dr Monique Lafon et le Dr Caroline Demeret pour l'énorme soutien qu'ils m'ont apporté, d'une façon ou d'une autre, durant toutes ces années. Chris, merci de tes conseils avisés et de m'avoir, par ce stage de Master 1, permis de démarrer ces années Pasteuriennes extrêmement enrichissantes.

Merci aux nombreuses personnes sur le campus pour les différents services apportés et aux personnes rencontrées lors de pauses devant le bâtiment pour des conversations toujours passionnantes. Merci Christine pour m'avoir initié à l'art du Tay Son Vo Dao à Pasteur.

Merci également à toutes les personnes qui, dans mon parcours universitaire, ont participé de près ou de loin à mon plan de carrière : Nicole Perret, Vincent Maréchal, Noël Tordo, Simona Ozden, Uriel Hazan.

Un immense merci à tous mes amis, entre confidences, fous-rires, moments de détente bien mérités, vous m'avez une fois de plus prouvé que l'on est riche de ses amis. Merci à la joyeuse bande du

Master 2 : Raph (ton oreille toujours attentive et tes conseils avisés dans tous les domaines), Rom (tout n'a pas été facile, mais tu m'as soutenue dans des moments durs et je t'en remercie), Yann (ta légendaire réserve de gâteaux et bonbons en tout genre, mais pas que…), Audrey (toujours à l'écoute et de bon conseil, même depuis les lointaines contrées canadiennes), Nadia (la joie de vivre incarnée, revisitée par l'esprit gabonais), Jean (tes allers-retours Paris/HK et tes anecdotes ont rythmé ces années), et tous les autres (je ne peux tous vous citer mais vous vous reconnaitrez), aux amis rencontrés grâce aux hasards de la vie, à Eric (best friend forever) et toute la fameuse bande des anciens de P1, 10 ans d'amitié déjà, et de nombreuses années d'amitié encore en perspective !

Merci à Saint-Malo pour m'avoir fait découvrir ce que « havre de paix » voulait dire… (Ce fut court mais intense !).

Je ne saurais jamais assez remercier ma famille, Maman et Pierrette (Tata Pépette), pour m'avoir toujours soutenue dans mon parcours, et plus particulièrement durant ces années de thèse, merci mille fois pour votre confiance, pour tout ce que vous avez fait pour moi… En toute sincérité le mot merci n'est pas assez fort, donc faute de mieux voici cette citation : « L'amour d'une maman, c'est la conviction que ses poussins sont des cygnes, ce qui est la meilleure façon de donner du moral à des enfants qui sont convaincus d'être de vilains petits canards », *Pam Brown.* Pour répondre à notre « Private Joke » : non, je ne serai pas fleuriste !!! :-)
Mamy, tu me manques chaque jour qui passe… J'aurais tant aimé que tu vois mes rêves se réaliser. Merci à l'infini, c'est grâce à toi que je suis devenue ce que je suis maintenant, merci de me protéger et de m'aider à tout instant ! A vous trois, je vous aime !!!
Je ne peux manquer également de remercier ma ménagerie de compèt' : Géro, Max, Lao, Nuts, Douchka, Tigrou, vous aussi par votre compagnie et même vos bêtises, vous m'avez aidée tout ce temps.

Enfin, un énorme merci à mon Nico pour être auprès de moi chaque jour, de me soutenir, me comprendre, d'être attentif, doux et protecteur comme tu sais si bien l'être et surtout de m'avoir supportée ces derniers temps, le stress m'a rendu atroce, j'en suis sincèrement désolée ! Merci de me faire sentir qu'à tes côtés, notre amour nous rend fort et que rien n'est impossible. « Aimer, ce n'est pas regarder l'un l'autre, c'est regarder ensemble dans la même direction. » *Saint-Exupery*. Nous le prouvons en permanence !

Cette thèse a été réalisée avec le soutien financier de l'**ANRS** et de la **Fondation Pasteur-Weismann.**

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS **19**

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX **21**

AVANT-PROPOS **23**

INTRODUCTION **29**

HEPATITE C ET VHC **31**
I. Hépatite C 31
1. Epidémiologie 31
2. Mode de transmission 31
3. Diagnostic 33
4. Symptômes et Evolution de la maladie 35
5. Rôle de la réponse immunitaire contre le VHC dans l'évolution de l'infection 37
6. Traitement 39
II. Le virus de l'hépatite C 41
1. Caractéristiques générales 41
1.1. Organisation génomique 43
1.2. Variabilité génétique 43
2. Formes naturelles du VHC 45
2.1. Les particules virales de faible densité 47
2.2. Les exosomes 47
2.3. Les nucléocapsides 49
2.4. Les virus enveloppés 49
3. Cycle viral 49
3.1. Récepteurs putatifs, attachement et entrée virale 51
3.2. Traduction et maturation 59
3.3. Réplication 59
3.4. Morphogénèse et sécrétion 61
3.5. Transmission intercellulaire de l'infection 63
4. Protéines virales 65
4.1. Protéines structurales 65
4.2. Protéines non structurales 73
III. Modèles expérimentaux 77
1. Modèles d'étude du VHC *in vitro* 77
1.1. Modèle réplicon 79
1.2. Pseudo particules virales 79
1.3. Modèles de culture cellulaire 81
2. Modèles d'étude du VHC *in vivo* 83
2.1. Chimpanzés 83
2.2. Tupaïas 83
2.3. Tamarins 85
2.4. Souris transgéniques uPA-SCID avec greffe d'hépatocytes humains 85

LE VHC ET LE METABOLISME DES LIPOPROTEINES **89**
I. Les différentes classes de lipoprotéines 89
1. Formation des VLDL 91
2. Formation des chylomicrons 91
3. Les récepteurs aux lipoprotéines 93
3.1. La famille des récepteurs aux LDL 93
3.2. Le récepteur scavenger SR-B1 93
3.3. Les HSPG 95
II. Les enzymes lipolytiques 95
1. La lipoprotéine lipase (LPL) 95
1.1. Structure 97
1.2. Fonctions 97
2. La lipase hépatique (HL) 101

2.1. Structure 101
2.2. Fonctions 101
III. Transport des lipoprotéines 103
1. Voie des lipides exogènes 103
2. Voie des lipides endogènes 105
3. Voie du transport reverse du cholestérol 105
IV. Interaction VHC - lipoprotéines 105
LE VHC ET LE TRANSPORT PAR LES MICROTUBULES 111
I. Les microtubules 111
1. Structure 111
2. Protéines moteurs 113
2.1. La kinésine 113
2.2. La dynéine 115
3. Fonctions dans une cellule normale 115
4. Fonctions dans une cellule infectée 115
II. Cytosquelette et VHC 117

OBJECTIFS DE THESE 121

RESULTATS 125

PARTIE I : ROLE DE LA LIPOPROTEINE LIPASE ET DES LIPOPROTEINES ASSOCIEES AU VIRUS DANS L'ENTREE ET L'INFECTION DE LA CELLULE PAR LE VHC 129
Article 1 141
Article 2 161
PARTIE II : ROLE DU RESEAU DE MICROTUBULES DANS L'ENTREE DU VHC ET LES ETAPES PRECOCES DE L'INFECTION 197
Article 3 209

DISCUSSION ET PERSPECTIVES 225

CONCLUSION GENERALE 247

BIBLIOGRAPHIE 251

ANNEXES 263

NOTES 275

LISTE DES ABREVIATIONS

aa : Acide Aminé
ADRP : Adipocyte Differentiation-Related Protein
AG : Acides Gras
ALAT : Alanine AminoTransférases
Apo : Apolipoprotéine
ARFP : Alternative Reading Frame Protein
ASAT : Aspartate AminoTransférases
CETP : Cholesterol Ester Transfer Protein
CHO : Chinese Hamster Ovary
CLDN : Claudine
CRE : Cis-acting Replication Element
Ct : C-terminal
DC-SIGN : Dendritic Cell- Specific Intracellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin
ECMV : Virus de l'encéphalomyocardite
EIA : Enzyme linked ImmunoAssay
ELISA : Enzyme linked Immunosorbent Assay
FFA : Free Fatty Acid
FXR : Farnesoide X Receptor
GAG : Glycosaminoglycanes
HCC : HépatoCarcinome Cellulaire
HCVcc : HCV cell culture
HCVpp : HCV pseudoparticle
HDL : High Density Lipoprotein
HL : Hepatic Lipase
HSPG : Héparanes Sulfates Protéoglycanes
hVAP-A : human Vesicle-Associated Membrane Protein-Associated Protein
HVR : Hyper Variable Region
IDL : Intermediar Density Lipoprotein
IFN : Interféron
Ig : Immunoglobuline
IL : Interleukine
IRES : Internal Ribosomal Entry Site
JFH : Japanese Fulminant Hepatitis
LD : Lipid Droplets
LDL : Low Density Lipoprotein
LPL : Lipoprotéine Lipase
LRP : LDL-receptor Related Protein
L-SIGN : Liver- Specific Intracellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin
LVP : Lipo-Viro-Particules
MLV : Virus de la leucémie murine
MP : Membrane plasmique
MTOC : Microtubules-Organizing Center
MTP : Microsomal Transfer Protein
NC : Non codant
NK : Natural killer cell
NO : Nitric oxyde
Nt : N-terminal
NTR : Non-Translated Region
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PEG : Polyéthylèneglycol
PPAR : Peroxisome Profiferator-Activated Receptor
PTB : Polypyrimidine Tract Binding protein
RAP : Receptor Associated Protein
RE : Reticulum Endoplasmique
RIBA : Recombinant ImmunoBlot Assay
RVS : Réponse Virologique Soutenue
RT-PCR : Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
RXR : Retinoic Acid Receptor
SCID : Severe Combined Immuno Deficiency
siRNA : small interference ARN
SR-B1 : Scavenger Receptor Classe B Type 1
STAT-C : Specifically Targeted Antiviral Therapy for hepatitis C
TG : Triglycéride
THL : Tétrahydrolipstatine
TM : Transmembranaire
TNF : Tumor Necrosis Factor
TRL : Triglyceride Rich ApoB-containing Lipoprotein
VHC : Virus de l'Hépatite C
VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine
VLDL : Very Low Density Lipoprotein
VLP : Virus Like Particles
VSV : virus de la stomatite vésiculaire

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1 : Prévalence mondiale de l'infection par le VHC 32
Figure 2 : Evolution de l'infection par le VHC 34
Figure 3 : Profil d'une hépatite C évoluant vers la chronicité 36
Figure 4 : Organisation génomique du VHC et maturation de la polyprotéine 42
Figure 5 : Représentation schématique de la répartition des différentes formes virales sériques visualisées en microscopie électronique en fonction de leur densité 44
Figure 6 : Cycle viral du VHC 48
Figure 7 : Représentation schématique des récepteurs putatifs du VHC 50
Figure 8 : Modèle d'entrée virale du VHC 56
Figure 9 : Modèle d'inhibition de l'entrée virale par EWI-2wint 58
Figure 10 : Modèle de morphogénèse du VHC 62
Figure 11 : Structure et association membranaire des protéines du VHC 64
Tableau 1 : Protéines virales et leur fonction dans le cycle viral du VHC 66
Figure 12 : Représentation des domaines linéaires de la protéine de capside 68
Figure 13 : Schéma de la protéine de capside du VHC 70
Figure 14 : Association de la protéine de capside du VHC aux gouttelettes lipidiques ou lipid droplets (LD) 72
Figure 15 : Fonctions connues de la protéine de capside du VHC 74
Figure 16 : Modèles *in vitro* d'étude du VHC 78
Figure 17 : Virus produit en culture cellulaire (HCVcc) 80
Figure 18 : Modèle de souris transgéniques « humanisées » 84
Figure 19 : Schéma d'une lipoprotéine 88
Tableau 2 : Composition en lipides et protéines des lipoprotéines majeures 90
Tableau 3 : Liste des diverses lipases humaines 94
Figure 20 : Structure de la LPL 96
Figure 21 : Fonctions de la lipoprotéine lipase (LPL) 98
Figure 22 : Voie des lipides exogènes 102
Figure 23 : Voie des lipides endogènes 104
Figure 24 : Voie du transport reverse du cholestérol 106
Figure 25 : Modèle de cosynthèse du VHC avec les ApoB 108
Figure 26 : Structure d'un microtubule 110
Figure 27 : Modèles de polymérisation dynamique 112
Figure 28 : Organisation des microtubules dans une cellule épithéliale hépatique polarisée 114
Figure 29 : Représentation schématique des protéines moteurs et protéines associées 116
Figure 30 : Transport dans la cellule 118
Figure 31 : Modèle décrivant le rôle putatif de l'association protéine de capside/LD dans le cycle viral du VHC 120
Figure 32 : Mécanisme d'entrée virale médiée par la LPL 122
Figure 33 : Approche expérimentale pour l'étude du rôle de la LPL sur l'infection par le VHC, *in vitro* et *in vivo* 154
Figure 34 : Rôle de SR-B1 dans l'entrée du VHC naturel 228
Figure 35 : mécanisme d'action de la LPL sur l'entrée du VHC 230
Figure 36 : Modèle d'entrée du VHC dans la cellule médiée par la LPL 236

AVANT-PROPOS

Le virus de l'hépatite C (VHC) représente le premier virus de l'histoire de la virologie moderne à avoir été identifié par les techniques de biologie moléculaire (Choo et al. 1989). Cependant, après 20 ans de recherches, plusieurs aspects majeurs concernant l'hépatite C ne sont toujours pas résolus.

D'une part, celle-ci reste un problème majeur de santé publique avec près de 3% de la population mondiale infectée (site internet OMS, 2007). Le passage à la chronicité est très élevé, avec évolution vers une cirrhose et à terme un hépatocarcinome cellulaire, et les traitements actuels restent peu efficaces, et associés à de nombreux effets secondaires indésirables.

D'autre part, en dépit des progrès rapides en biologie moléculaire, nos connaissances sur certaines étapes du cycle viral, notamment l'entrée virale et la morphogénèse, et sur la nature même des particules virales restent limitées. Leur compréhension demeure actuellement un objectif majeur de la recherche fondamentale sur le VHC.
La mise au point en 2005 par Wakita et al d'un modèle cellulaire permettant une infection productive avec sécrétion de particules infectieuses a constitué une avancée majeure dans la recherche sur le VHC (Wakita et al. 2005; Zhong et al. 2005; Lindenbach et al. 2006). En dépit de ses limites intrinsèques, ce système représente actuellement le modèle de référence pour l'étude du VHC en culture cellulaire.

En outre, ce virus possède certaines particularités : plusieurs formes virales circulent dans le sérum de patients et présentent un profil de densité très hétérogène, du fait de leur association à des lipoprotéines et que ces particules soient recouvertes d'anticorps (Thomssen al. 1992; Hijikata et al. 1993; Prince et al. 1996). Les particules de plus faible densité correspondent aux densités de l'apolipoprotéine B (ApoB) et sont les plus infectieuses chez le chimpanzé et en culture cellulaire (Bradley et al. 1991; Agnello et al. 1999; Andre et al. 2002 et 2005; Lindenbach et al. 2006). Ces observations incitent à poser la question du rôle des lipides dans le cycle viral. L'équipe de Patrice André a montré en 2002 que ces particules de faible densité correspondaient aux lipo-viro-particules (LVPs), constituées par l'ARN viral, la protéine de capside, les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 et les apolipoprotéines ApoB et E (Andre et al. 2002).

Au vu de l'importance des lipoprotéines dans le cycle viral, en particulier dans l'entrée virale, nous nous sommes intéressés au rôle d'une enzyme clé du métabolisme lipidique, la lipoprotéine lipase (LPL), dans les mécanismes d'entrée et d'infection du VHC.

Notre équipe étudie depuis de nombreuses années les propriétés de la protéine de capside (Maillard et al. 2001; Maillard et al. 2004). La présence de nucléocapsides non-enveloppées dans le sérum de patients infectés a été démontrée (Maillard et al. 2001). La protéine de capside a de nombreux effets sur les fonctions cellulaires de l'hôte et dans les mécanismes d'échappements à la réponse immunitaire de l'hôte. Ceci nous a conduits à rechercher de nouveaux partenaires cellulaires de la protéine de capside. D'autre part, les microtubules ayant des fonctions cruciales dans le cycle viral de nombreux virus (Dohner et al. 2005; Leopold 2006), nous avons voulu étudier le rôle de ce réseau dans l'entrée virale et l'infection par le VHC. En outre, une autre particularité du VHC est la présence chez les patients infectés d'une stéatose hépatique, correspondant à l'accumulation de gouttelettes lipidiques ou lipid droplets (LD) dans les hépatocytes. Ces LD sont des organelles intracellulaires contenant des réserves lipidiques, composées d'un cœur de triacylglycérol et d'esters cholestérol, entouré par une seule couche de phospholipides, elle-même entourée d'une couche de protéines. Plus récemment, il a été montré que la protéine de capside du VHC s'associait aux LD et que ces dernières étaient impliquées dans de nombreuses voies cellulaires incluant un engagement avec les microtubules. Il existe donc un lien direct entre le réseau de microtubules et le cycle viral du VHC, lui-même étroitement lié au métabolisme lipidique.

Partant de ces observations et dans le contexte de nos travaux sur l'entrée virale, nous avons cherché à élucider le rôle des microtubules dans ces mécanismes d'entrée et d'infection de la cellule par le VHC.

INTRODUCTION

HEPATITE C ET VHC

En 1989, l'identification du virus nommé virus de l'hépatite C (VHC) est effectuée par l'équipe de Houghton (entreprise Chiron) par biologie moléculaire (Choo et al. 1989). La stratégie de découverte du VHC est alors novatrice puisqu'elle fait appel à la réalisation d'une banque d'expression dans un bactériophage. Cette découverte a permis le développement rapide de tests sérologiques et par la suite le clonage de la séquence complète du génome viral (Houghton 2009).

I. Hépatite C

1. Epidémiologie

D'après l'OMS (2007), la prévalence de l'infection par le VHC est de 170 millions de porteurs chroniques et 3 à 4 millions de personnes infectées par an dans le monde, soit près de 3% de la population mondiale (5 fois le taux d'infection par le virus de l'immunodéficience humaine VIH-1). Cela constitue donc un problème majeur de santé publique, puisqu'en effet, l'infection chronique par le VHC est la principale cause de cirrhose, cancer du foie et indication de transplantation hépatique dans les pays occidentaux.

Cette prévalence varie suivant les zones géographiques. En France, 600 000 personnes seraient infectées. Les estimations de la prévalence selon les régions sont représentées sur la carte Figure 1.

Il faut cependant noter que l'évaluation de la prévalence est certainement sous-estimée car les études sont menées auprès des donneurs de sang, constituant une population sélectionnée probablement différente de la population générale (Sy 2006).

2. Mode de transmission

Le VHC est un virus hépatotrope mais diverses données indiquent également sa présence dans des cellules mononuclées du sang périphérique (lymphocytes B, monocytes/macrophages, cellules dendritiques). Il est doué d'une forte spécificité d'espèce et de type cellulaire. En l'absence de réservoir animal, l'infection se transmet de manière interhumaine directe.

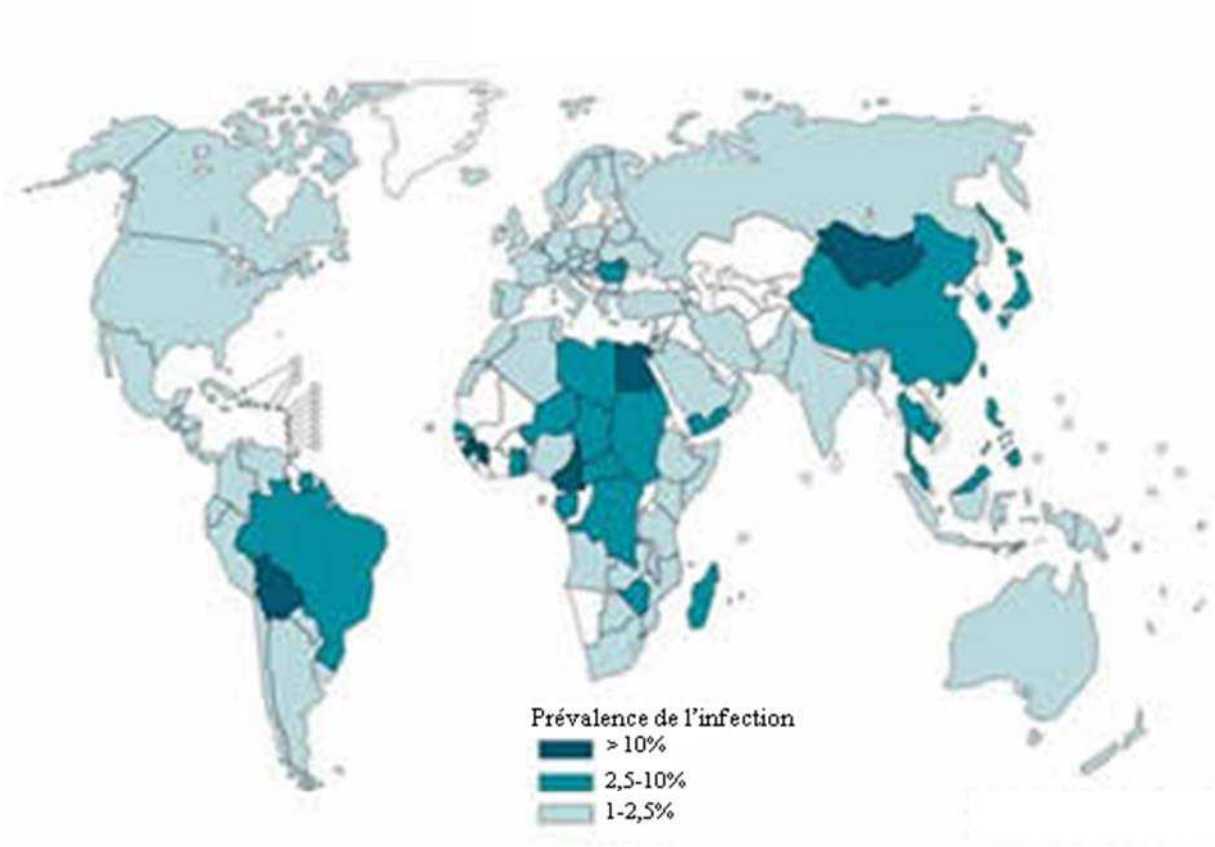


Figure 1 : Prévalence mondiale de l'infection par le VHC (Source : OMS)
Cette carte représente la prévalence du VHC en 2007 au niveau mondial, exprimée en pourcentage de la population infectée par pays. Les régions les plus fortement touchées sont l'Afrique (Egypte en particulier – 22%), l'Amérique Latine et l'Asie du Sud-Est.

La contamination s'effectue quasi exclusivement par voie sanguine (utilisation de drogues par voie intraveineuse, actes médicaux invasifs tels que transfusion sanguine ou transplantation) (Sy 2006).
Les transmissions du VHC de la mère à l'enfant, comme par voie sexuelle, sont rares et très controversées (Roberts 2002). Il faut cependant noter que la coinfection avec le VIH augmente ces taux de transmission. Pour 30% des cas d'infection, il n'existe aucun facteur de risque identifié (Lauer 2001).

3. Diagnostic

Il existe 2 types de tests diagnostiques : sérologiques et moléculaires (Lauer 2001; Chevaliez 2009).

Les tests sérologiques sont basés sur la recherche d'anticorps anti-VHC dirigés contre les protéines virales. L'EIA (Enzyme linked ImmunoAssay) est un titrage immunoenzymatique permettant de détecter le virus chez plus de 95% des porteurs chroniques, le taux de détection étant de l'ordre de 50 à 70% pendant la phase aigue. Un test RIBA (Recombinant ImmunoBlot Assay) est souvent réalisé pour confirmer un résultat positif obtenu par titrage EIA et met en évidence les anticorps réagissant avec certains antigènes du VHC (Chevaliez 2009).

Un test moléculaire sur l'ARN du VHC, par une technique d'amplification de l'ARN viral (RT-PCR pour Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) peut aussi être réalisé pour confirmer les résultats des tests sérologiques. Cette technique est également utilisée depuis peu pour le diagnostic et le suivi des patients du fait de ses nombreux avantages (simplicité, rapidité) aidant à la mise en place d'une meilleure prise en charge thérapeutique des patients infectés.

Enfin, le génotypage permet d'adapter au mieux le traitement (durée et dose). Son principe repose sur un séquençage direct de la région 5' non codante de l'ARN viral. La spécificité du test est très bonne pour déterminer les génotypes (cf chapitre I.1.2.) mais légèrement plus faible pour les sous-types (Forns 2006).

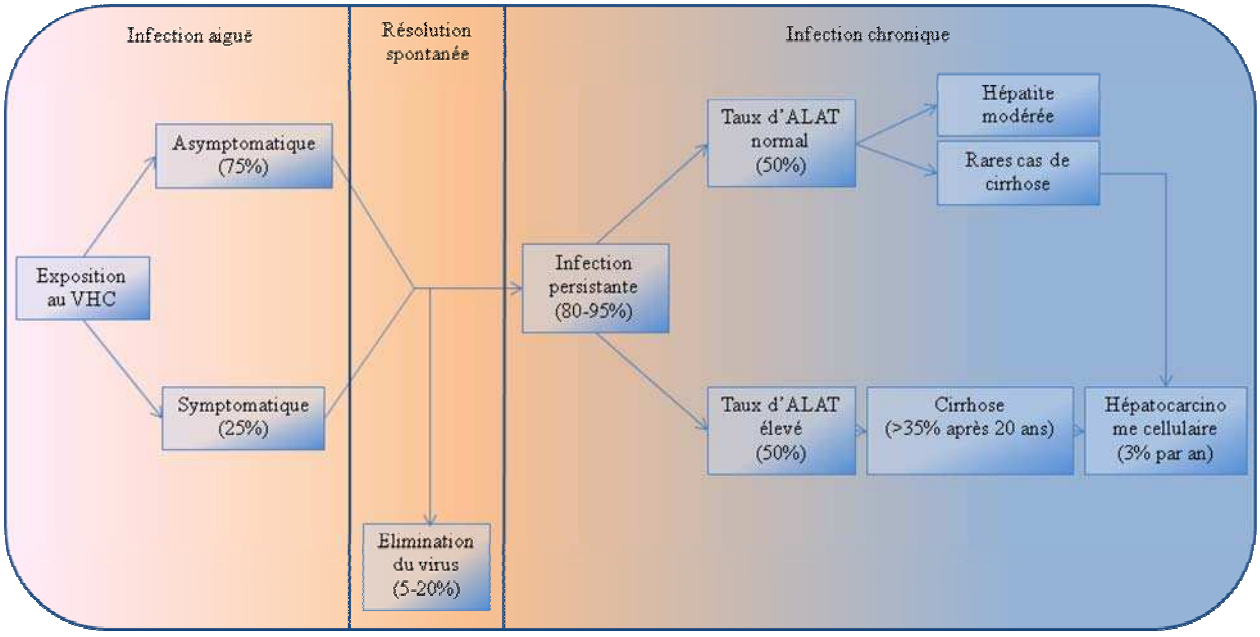


Figure 2 : Evolution de l'infection par le VHC. D'après Zoulim, *Reviews in Medical Virology* (Zoulim et al. 2003)

L'infection par le VHC, le plus souvent asymptômatique, conduit majoritairement à une hépatite chronique, susceptible d'évoluer vers une cirrhose et à terme un HCC.

D'autres paramètres, importants mais non spécifiques à l'hépatite C, sont également utilisés pour le diagnostic, notamment dans le suivi des pathologies associées. Ils seront développés dans le chapitre I.4.

4. Symptômes et Evolution de la maladie

4.1. Hépatite aiguë

La caractéristique première de l'infection par le VHC est d'être le plus souvent asymptomatique dans sa phase aigue, qui survient 4 à 12 semaines après la contamination (Figure 2).

Près de 20% des individus infectés parviennent à éliminer spontanément le virus, étape souvent associée à une hépatite dite aigue mais silencieuse, qui se traduit par un ictère (25% des cas seulement) accompagné de symptômes non spécifiques (fatigue, malaises, nausées). Des cas d'hépatite fulminante ont été rapportés mais ils sont rarissimes.

Les anticorps anti-VHC n'apparaissent que dans 50 à 70% des cas dans la phase aigüe et seulement plusieurs semaines après la contamination.

L'ARN viral est détectable 1 à 3 semaines après la contamination, souvent en même temps qu'une élévation du taux de transaminases sériques, 10 fois supérieure à la normale. Ces transaminases, ALAT (Alanine AminoTransférases) et ASAT (Aspartate AminoTransférases) participent à la synthèse et la dégradation des acides aminés dans l'hépatocyte et leur élévation est synonyme d'une atteinte hépatique.

La guérison de l'hépatite C correspond à une absence de détection d'ARN viral et à un retour à un taux basal de transaminase. Le taux d'anticorps anti-VHC diminue progressivement mais reste détectable pendant plusieurs années chez les patients ayant spontanément éliminé le virus (Santantonio et al. 2008).

4.2. Hépatite chronique

Si au bout de 6 mois, le virus n'est toujours pas éliminé, on parle alors d'hépatite chronique (70 à 85% des cas).

Les symptômes sont le plus souvent absents ou modérés et peu spécifiques (fatigue, troubles digestifs, douleurs diffuses…). Le taux de transaminase peut fluctuer au cours de l'infection chronique. C'est néanmoins un marqueur de l'évolution de l'atteinte hépatique. La présence constante d'anticorps anti-VHC est constatée. L'ARN viral est détecté à des taux importants

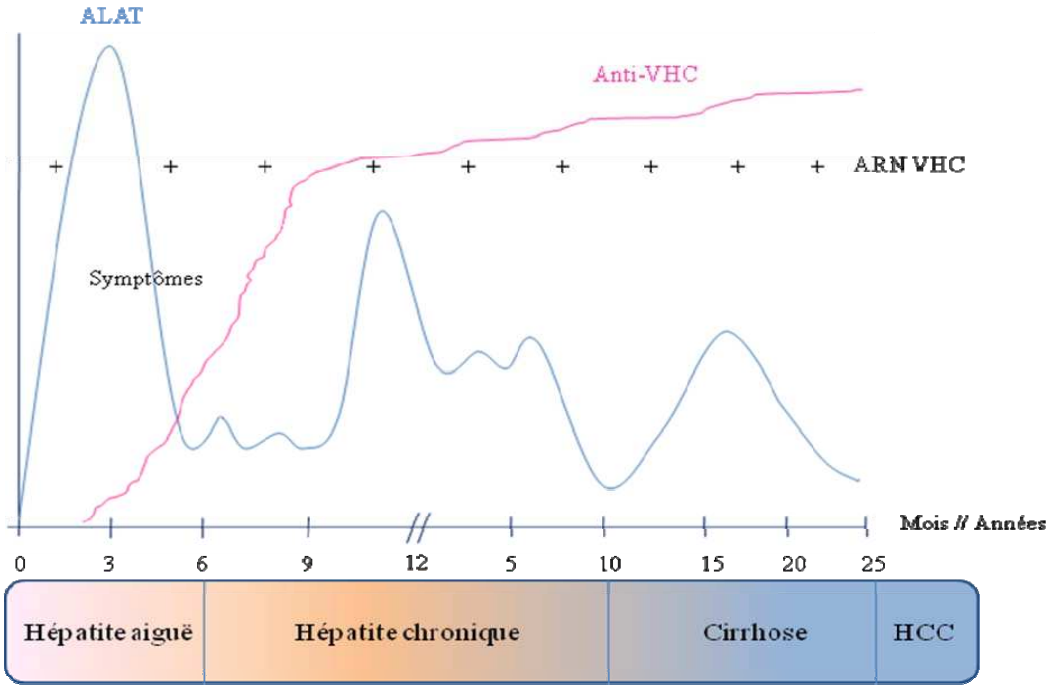


Figure 3 : Profil d'une hépatite C évoluant vers la chronicité. D'après Zoulim ; *Reviews in Medical Virology* (Zoulim et al. 2003)

L'hépatite aiguë peut être accompagnée de symptômes non spécifiques. L'ARN viral et le pic de transaminases apparaissent simultanément et les anticorps anti-VHC plus tardivement. La chronicité se traduit par la présence persistante d'ARN viral, d'anticorps anti-VHC et des taux variables de transaminases.

chez les malades (Figure 3). Cette persistance virale est liée à une réponse immunitaire défective, conséquence d'un échappement viral (Ishii 2008).

Bien que des méthodes non invasives alternatives à la biopsie hépatique, telles que la détection de marqueurs biochimiques de fibrose hépatique ou FibroTest (Imbert-Bismut et al. 2001; Poynard et al. 2004) soient en cours de validation, le meilleur outil pour suivre la progression de la maladie dans le foie reste l'analyse histologique après biopsie hépatique. L'hépatite chronique se traduit par une dégradation des cellules du foie, la formation de tissus cicatriciels pathologiques ou fibrose. La fibrose est susceptible d'évoluer vers une cirrhose (20% des cas) généralement une dizaine d'années après la contamination (Figure 2). A ce stade, 1 à 4% des patients développent un hépatocarcinome cellulaire (HCC) et une insuffisance hépatique pouvant être à l'origine du décès (espérance de vie à 5 ans : 50%). La cirrhose liée au VHC est une des premières indications de transplantation hépatique en France.

De plus, il existe d'autres manifestations extra hépatiques en relation avec l'infection ainsi que divers types de lésions non spécifiques souvent rencontrées dans l'hépatite chronique.

Différents facteurs influencent la progression de la maladie ainsi que son traitement : facteurs dépendant de l'hôte (âge, sexe, poids), environnementaux (alcool, tabac, coinfection), mais leur rôle reste encore mal défini (Schutte et al. 2009; Tang 2009).

5. Rôle de la réponse immunitaire contre le VHC dans l'évolution de l'infection

Une réponse innée est mise en place très rapidement par sécrétion d'interféron de type I IFNα/β par les cellules infectées et par la stimulation des cellules NK. Par ailleurs, des chimiokines seraient sécrétées au cours de l'infection précoce par le VHC (Meurs 2007).

Une réponse adaptative humorale apparait très tôt au cours de la phase aigue, mais échoue à contrôler l'infection et est donc responsable en partie du phénomène de persistance virale.

L'élimination spontanée du VHC est corrélée à l'apparition d'une réponse adaptative cellulaire T $CD4^+$ et $CD8^+$, puissante et polyspécifique, c'est-à-dire dirigée contre de multiples épitopes du virus, avec infiltration du foie par ces cellules. Les T $CD4^+$ sécrètent des cytokines antivirales et activent les T $CD8^+$ ainsi que les lymphocytes B spécifiques du virus.

La persistance virale est associée à une réponse cellulaire trop faible ou inapte à l'élimination totale du virus. Elle pourrait aussi être liée à l'interférence du VHC avec la réponse immunitaire innée (Rehermann 2009).

La réponse immune joue également un rôle dans la pathogénèse hépatique, notamment par la destruction des hépatocytes par les cellules T cytotoxiques et les cellules NK et par la production de cytokines inflammatoires que sont l'IFNγ et le TNFα (réaction inflammatoire provoquant des dommages tissulaires) (von Hahn et al. 2007; Ishii 2008; Myrmel et al. 2009; Tang 2009).

6. Traitement

6.1. Traitement actuel

Actuellement, le traitement consiste en l'administration une fois par semaine en intraveineuse d'IFNα pégylé (PEG-IFN-α), la présence du polyéthylèneglycol (PEG) prolongeant la durée de vie et renforçant l'action biologique de l'IFNα, en association à une prise quotidienne de ribavirine, pendant une durée de 6 mois à un an. L'IFNα est une cytokine antivirale capable de déclencher une réaction immunitaire efficace, d'inhiber la réplication du virus et ayant des effets immunomodulateurs. La ribavirine quant à elle est un analogue nucléosidique de la guanosine permettant de favoriser les erreurs de réplication par son incorporation à l'ARN viral et donc d'inhiber faiblement l'ARN polymérase (Pawlotsky 2003; Chevaliez 2009). Ce traitement permet de limiter l'émergence de quasi-espèces virales (cf chapitre I.1.2.). On parle de guérison ou plus précisément de réponse virologique soutenue (RVS) lorsque le taux de transaminases revient à la normale et que l'ARN viral est indétectable 24 semaines après arrêt du traitement.

Le taux de réponse varie néanmoins considérablement en fonction des génotypes (80% pour les génotypes 2 et 3 contre 40-50% pour le génotype 1). Chez certains patients, dits non répondeurs, aucune activation de la réponse antivirale n'est observée : le système immunitaire semble réfractaire à toute stimulation (Sarasin-Filipowicz et al. 2008).

Ce traitement présente toutefois des inconvénients majeurs : de nombreux effets secondaires indésirables de type grippaux, cytopénie (leucocytes, plaquettes) et état dépressif pour l'IFN, nausées et anémie pour la ribavirine, ainsi que le développement de résistance à ce traitement. Il est donc primordial de mettre au point un vaccin et/ou de nouvelles molécules permettant d'agir sur les différentes étapes du cycle viral.

6.2. Perspectives

Outre les recherches visant à améliorer la tolérance au traitement standard, de nouvelles molécules spécialement dirigées contre le VHC (STAT-C : Specifically Targeted Antiviral Therapy for hepatitis C) sont en cours d'étude (certaines sont actuellement en phase I, II ou III d'essais cliniques). L'Albuferon (Human Genome Sciences), molécule dérivée de l'IFN (albumine couplée à l'IFNα) semble permettre une diminution de la réplication avec seulement 1 à 2 injections par mois et l'Isatoribine, « interféron inducteur » par voie orale, semble également être prometteur. Des inhibiteurs spécifiques des protéines virales (protéines décrites au chapitre I.2.2) sont actuellement développés, ciblant plus ou moins efficacement toutes les étapes du cycle viral. Ainsi, la protéase NS3/4A est la cible de peptides mimant ses substrats. Des inhibiteurs de l'ARN polymérase NS5B, un inhibiteur de l'action des cyclophilines A et B (cofacteurs indispensables à l'action de NS5B) semblent capables de réduire la charge virale, seuls ou en association avec l'IFNα. Il ressort également d'une étude avec DEBIO-025 que celui-ci inhibe le VHC indépendamment du génotype (Pawlotsky et al. 2007; Flisiak et al. 2008; de Bruijne et al. 2009; Sakamoto 2009; Webster et al. 2009). Bien que des effets toxiques soient là encore présents, ces différentes molécules demeurent tout de même les candidats les plus prometteurs actuellement, car lors de trithérapie, leur effet antiviral s'additionne à celui de l'IFN pégylé et de la ribavirine.

II. Le virus de l'hépatite C

1. Caractéristiques générales

Le séquençage complet du génome du VHC a permis de le classer dans la famille des *Flaviviridae*, qui comprend les genres Flavivirus (ex : virus de la fièvre jaune) et Pestivirus (ex : virus de la diarrhée bovine). Son organisation génomique, proche du genre Pestivirus, mais présentant néanmoins une faible identité de séquence, a entrainé son classement dans un genre nouveau, Hepacivirus, qui comprend également les virus GB (Beames et al. 2000).

Le VHC est un virus enveloppé, à ARN simple brin positif et non segmenté contenu dans une capside protéique icosaédrique.

L'isolement de virions et leur observation en microscopie électronique se sont avérés très difficiles du fait des faibles titres viraux dans les échantillons biologiques et de leur association avec les lipoprotéines. Des particules virales de 50 à 65nm de diamètre, localisées

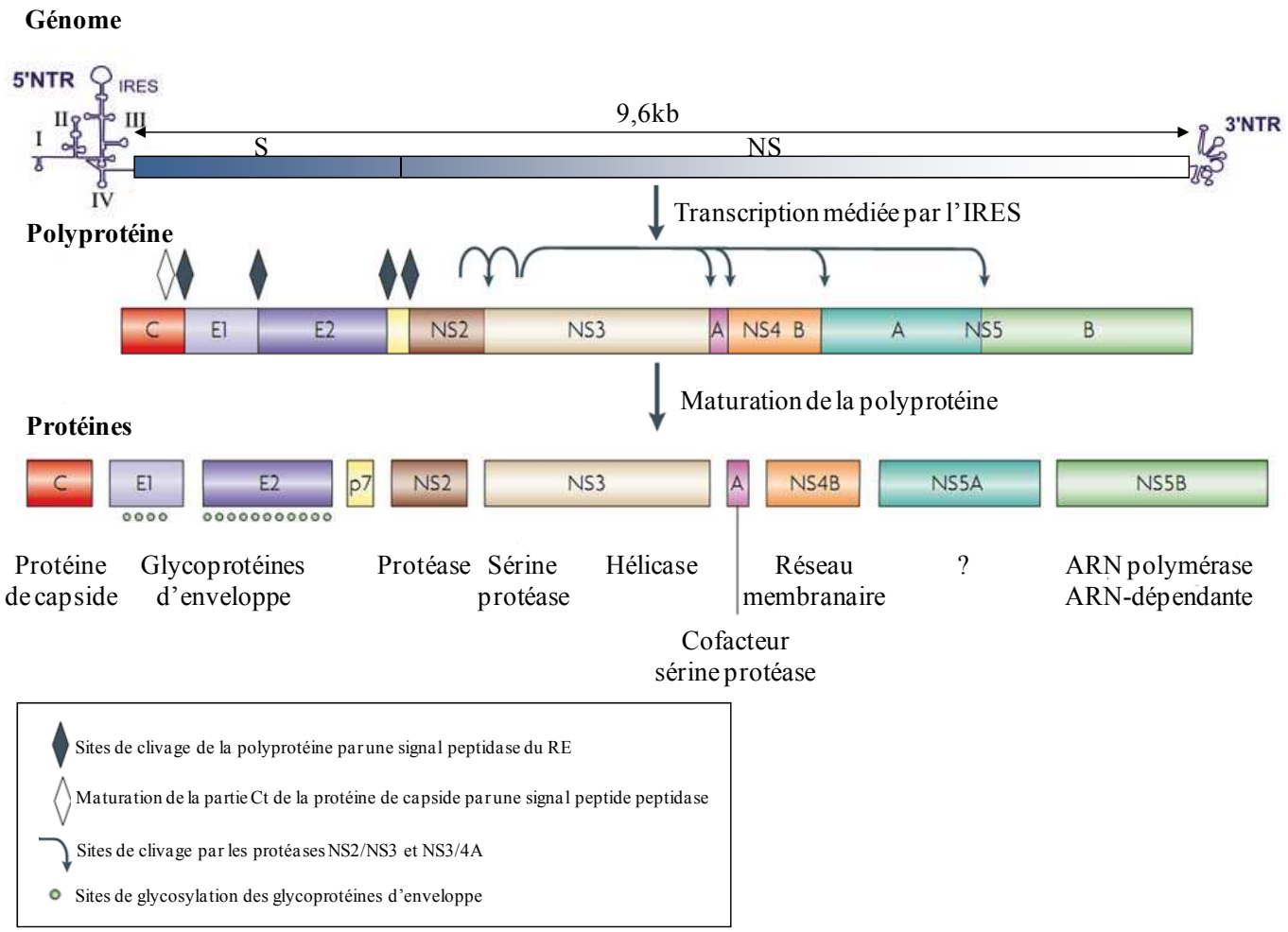


Figure 4 : Organisation génomique du VHC et maturation de la polyprotéine. D'après Pénin, *Hepatology* et Moradpour, *Nature* (Penin et al. 2004; Moradpour et al. 2007)

L'ARN génomique est schématiquement représenté ici, ainsi que la polyprotéine précurseur dont la traduction est médiée par l'IRES. La maturation de la polyprotéine conduit, après clivage par des protéases cellulaires et virales, à la formation des protéines structurales et non structurales. Les protéines structurales sont les premières à être maturées par les signal peptide peptidase et signal peptidase du RE. Les protéines non structurales sont quant à elles issues des clivages par NS2/NS3 et NS3/4A.

S : séquence codant les protéines structurales ; NS : séquence codant les protéines non structurales

au sein de vésicules cytoplasmiques, ont cependant pu être visualisées dans différents organes et lignées cellulaires (Shimizu et al. 1996; Wakita et al. 2005; Kaito et al. 2006), mais ces observations restent à confirmer.

1.1. Organisation génomique

Le génome du VHC est composé d'un ARN simple brin de polarité positive, d'environ 9600 nucléotides constituant un cadre ouvert de lecture, bordé en 5' et 3' par deux régions non codantes (5'NC et 3'NC) (Figure 4).

La région 5'NC, très structurée et hautement conservée, contient un site interne d'entrée du ribosome ou IRES (Internal Ribosomal Entry Site), essentiel à la traduction de l'ARN viral. Quatre domaines constituent l'IRES, les domaines II, III et IV étant requis pour la traduction et les domaines I et II essentiels pour la réplication de l'ARN viral.

La région 3'NC, également très structurée, est composée d'une courte région variable non traduite de 30 nucléotides, d'une séquence poly(U/UC) conservée d'environ 80 nucléotides essentielle à la réplication, et d'une région 3' terminale très conservée, la région X, de 98 nucléotides repliée en trois structures tige-boucle.

Le génome du VHC comporte également une séquence importante pour la réplication, la région CRE (Cis-acting Replication Element), codant la région C terminale de la protéine NS5B. Une structure tige-boucle de cette séquence a été identifiée comme étant capable d'interagir avec une séquence tige-boucle de la région X, ce qui jouerait un rôle important dans l'initiation de la synthèse du brin de polarité négative au cours de la réplication.

La traduction du génome viral aboutit à la synthèse d'une polyprotéine virale de 3000 acides aminés (aa), clivée par des protéases cellulaires et virales pour former les protéines structurales que sont la protéine de capside C, la protéine F et les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2, la viroporine P7, et les protéines non structurales que sont NS2, NS3, NS4A et B, et NS5A et B (Figure 4) (Moradpour et al. 2007).

1.2. Variabilité génétique

Comme c'est généralement le cas pour les virus à ARN, le VHC présente une grande variabilité génétique due à un taux de réplication très élevé (10^{10} à 10^{12} virions produits par jour) et à l'absence d'activité 3'-5' exonucléase correctrice de son ARN polymérase ARN-

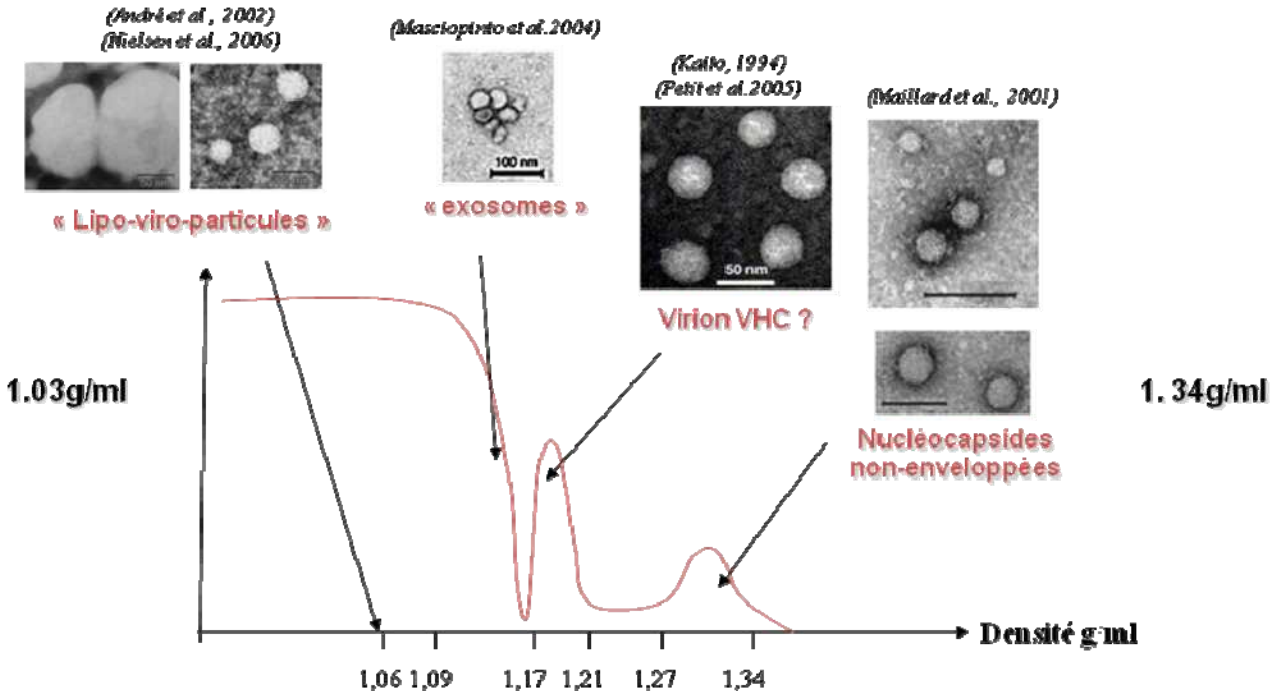


Figure 5 : Représentation schématique de la répartition des différentes formes virales sériques visualisées en microscopie électronique en fonction de leur densité (d'après Patrice André)

dépendante, ce qui entraine un taux de mutation important (1,5 à 2.10^{-3} mutations par nucléotide copié par an) (Bukh et al. 1995).

Si la majorité des séquences ainsi générées sont défectueuses, les mutations non létales sont transmises au cours de l'évolution et confèrent des avantages ou des désavantages sélectifs qui aboutissent à l'émergence de génotypes viraux particuliers au sein d'une population dans une zone géographique donnée et sont également responsables de l'apparition de quasi-espèces virales chez les individus. Les quasi-espèces sont des variants viraux génétiquement distincts mais apparentés chez un même individu au cours d'une infection.

L'évolution du génome viral se fait en fonction de pressions de sélection exercées par des contraintes conformationnelles au niveau de la structure de l'ARN et la nécessité de conserver la fonctionnalité des protéines virales, ainsi que par des pressions liées à la réponse immunitaire de l'hôte et à son environnement (infections, traitements).

La variabilité génétique n'affecte cependant pas les différentes parties du génome de façon homogène, les séquences des protéines d'enveloppe étant les plus variables et celles de la région 5'NC et de la capside étant notamment très conservées.

L'analyse phylogénétique des séquences partielles ou complètes du génome a conduit au classement des variants en six génotypes (différant d'environ 30%), eux-mêmes subdivisés en une centaine de sous-types (divergeant d'environ 25%) (Simmonds et al. 2005). La répartition des différents génotypes varie selon les régions du globe, avec une forte prévalence des génotypes 1a et 1b aux USA (80%) et en Europe (60%), des génotypes 1 et 2 en Afrique et du génotype 1 en Asie. Une prévalence particulière du génotype 4a est observée en Egypte et en Afrique Centrale. Le génotype 5a est exclusivement présent en Afrique du Sud et le 6a en Chine (Sy 2006).

D'un point de vue biologique, le génotype semble influer sur la sévérité de la maladie et la réponse au traitement (Abraham et al. 2009). Le génotype 1 serait associé à une pathologie plus sévère et le génotype 3 à une plus grande fréquence de stéatose hépatique (accumulation de vésicules graisseuses dans les hépatocytes) (Pawlotsky et al. 1999; Soler et al. 2002).

2. Formes naturelles du VHC

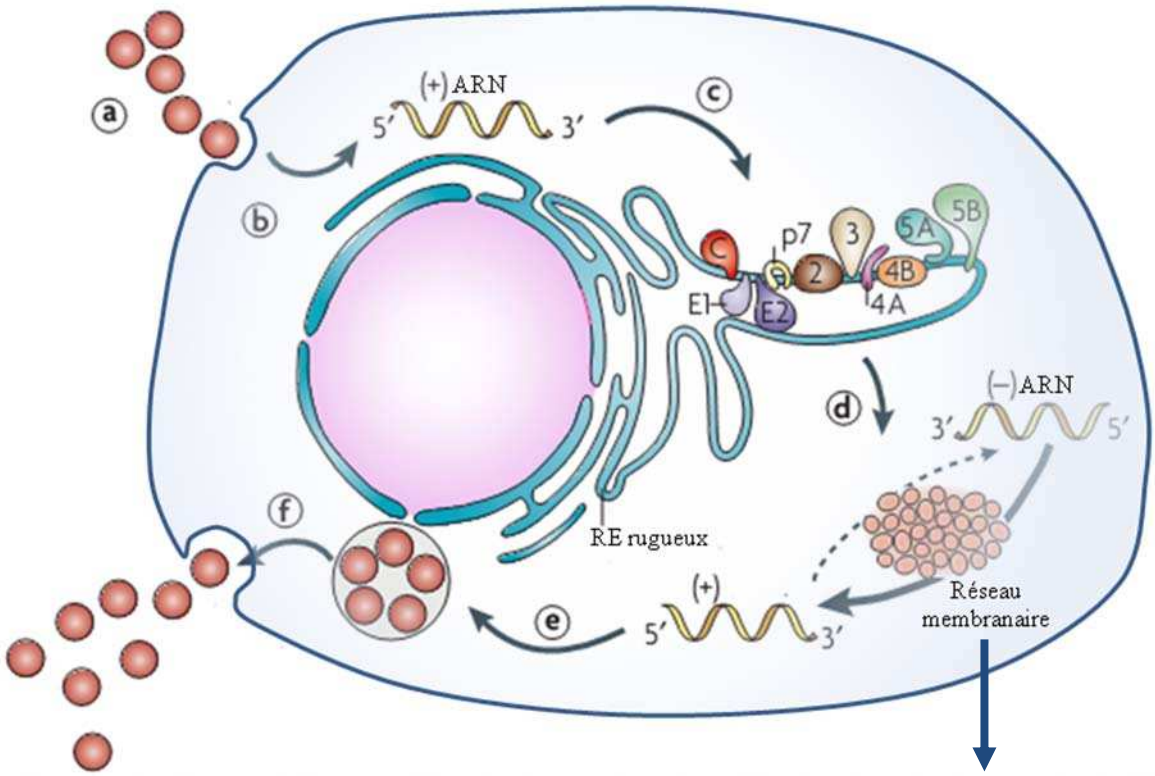
Plusieurs formes virales ont été isolées à partir du sérum de patients infectés et présentent un profil de densités très hétérogène (1,06 à 1,34g/ml) (Bradley et al. 1991; Maillard et al. 2001; Andre et al. 2002; Masciopinto et al. 2004; Petit et al. 2005; Lindenbach et al. 2006; Nielsen et al. 2006) (Figure 5).

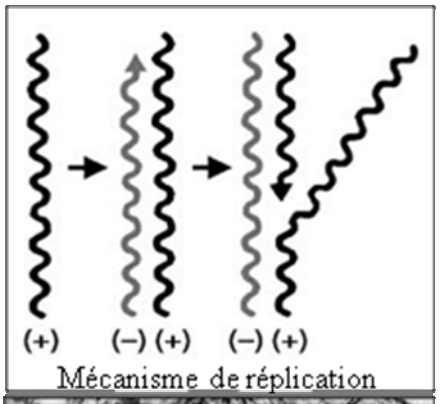
2.1. Les particules virales de faible densité

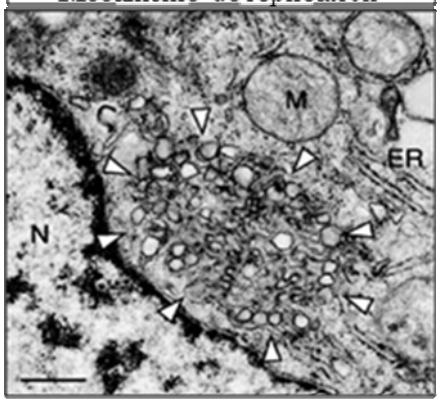
Après centrifugation du sérum sur gradient de densité, le VHC est majoritairement retrouvé dans les fractions légères (1,06 à 1,17g/ml), du fait de son association aux lipoprotéines (Thomssen et al. 1992; Prince et al. 1996; Agnello et al. 1999; Andre et al. 2002 et 2005). Cette association se fait au cours de la formation des particules virales (cf chapitre I.3.4.). Les fractions de densités les plus faibles sont également les plus infectieuses, à la fois *in vitro* en culture cellulaire (Agnello et al. 1999; Andre et al. 2002 et 2005; Lindenbach et al. 2006) et *in vivo* chez le chimpanzé (Bradley et al. 1991). De plus, ces particules virales associées aux lipoprotéines sont aussi infectieuses chez l'homme, comme l'a montré une étude comparant les séquences d'isolats provenant de patients infectés en phase aiguë ou chronique : les séquences des quasi-espèces virales provenant des patients en phase aiguë se superposant avec la séquence consensus (isolat phase chronique) sont retrouvées dans les fractions de faible densité (Diaz et al. 2008). Ces résultats suggèrent que l'association de ces particules virales avec des lipoprotéines est un facteur déterminant de leur infectiosité *in vivo* (Figure 5). Plusieurs travaux ont été effectués dans le but d'analyser la structure de ces particules virales sériques associées aux lipoprotéines. Il a été montré que chez les patients immunocompétents, ces particules sont recouvertes d'anticorps, ce qui pourrait contribuer à leur hétérogénéité (Hijikata et al. 1993). Cette propriété a été utilisée pour purifier une population de particules virales de faible densité (associées aux LDL et VLDL), nommées les lipo-viro-particules (LVP) (Andre et al. 2002). Les LVP contiennent l'ARN viral, la protéine de capside, les protéines d'enveloppe E1 et E2 et les apolipoprotéines B et E. Elles ont un diamètre de 100nm et possèdent une structure dense (Figure 5). Leur délipidation laisse apparaitre les nucléocapsides du VHC (30 à 50nm). Les LVP ne représentent probablement pas la totalité de la fraction légère mais sont actuellement les seules à y avoir été caractérisées.

2.2. Les exosomes

Des travaux suggèrent qu'une majeure partie de l'ARN viral circulant dans le sérum de patient est retrouvée dans les exosomes (Masciopinto et al. 2004). Ceux-ci sont de petites vésicules membranaires de 60 à 100nm de diamètre formées à partir de la fusion de plusieurs vésicules endosomales et sécrétées par les cellules. Elles contiennent, chez les patients infectés, de l'ARN viral, les glycoprotéines d'enveloppe ainsi que la tétraspanine CD81 (mais







Membranous web

Figure 6 : Cycle viral du VHC
D'après Moradpour, *Nature* (Moradpour et al. 2007)

a. Liaison et internalisation
b. Libération cytoplasmique et décapsidation
c. Traduction et maturation de la polyprotéine
d. Réplication de l'ARN
e. Assemblage
f. Maturation et libération du virion

La réplication a lieu dans un endroit particulier, le réseau membranaire ou « membranous web ».
La morphogénèse et la sécrétion du VHC requièrent l'association du virus aux lipoprotéines.
Le VHC suit la voie de sécrétion des VLDL.

pas la protéine de capside). Leur densité exacte n'est pas connue mais les exosomes sont généralement retrouvés à des densités comprises entre 1,08 et 1,22g/ml.

2.3. Les nucléocapsides

Certaines études suggéraient la présence dans le sérum de patients d'une fraction immuno-précipitable par des anticorps anti-capside (Takahashi et al. 1992). La présence de nucléocapsides non-enveloppées dans le sérum de patients a pu être mise en évidence par notre équipe (Maillard et al. 2001). Leur densité est comprise entre 1,27 et 1,34g/ml (gradient de chlorure de césium). D'après l'observation en microscopie électronique, elles mesureraient entre 38 et 62nm. Ces résultats confortent donc l'existence de nucléocapsides circulant dans le sérum de patients, qui seraient soit sécrétées par la cellule infectée, soit libérées après lyse hépatique, et montrent également pour la première fois leurs propriétés physico-chimiques.

2.4. Les virus enveloppés

Des structures ressemblant à des particules ont pu être visualisées en microscopie électronique dans des hépatocytes de chimpanzés en phase aiguë de l'infection (De Vos et al. 2002). Ces particules mesurent environ 50nm de diamètre et sont reconnues par des anticorps anti-capside et anti-enveloppe. Les auteurs soulignent néanmoins la difficulté d'une telle observation. Aucune particule n'a pu être observée dans des biopsies de foie humain infecté. A partir de sérum de patients, des particules « flavivirus-like » ont pu être isolées par ultracentrifugation (Petit et al. 2005). Parmi celles-ci, deux populations contenant la capside et l'ARN viral ont pu être caractérisées : l'une correspond à des particules ne contenant pas d'enveloppe (densités de 1,06 à 1,08g/ml), l'autre à des particules contenant les protéines E1 et E2 (densités de 1,17 à 1,21g/ml).

3. Cycle viral

Durant plusieurs années, du fait de l'absence de modèles cellulaires permettant une réplication efficace et stable du VHC, la compréhension du cycle viral a été fortement ralentie. En 2005, la mise au point d'un modèle de culture *in vitro* a permis une avancée considérable des connaissances (Wakita et al. 2005; Zhong et al. 2005; Lindenbach et al. 2006), permettant de proposer le modèle présenté Figure 6.

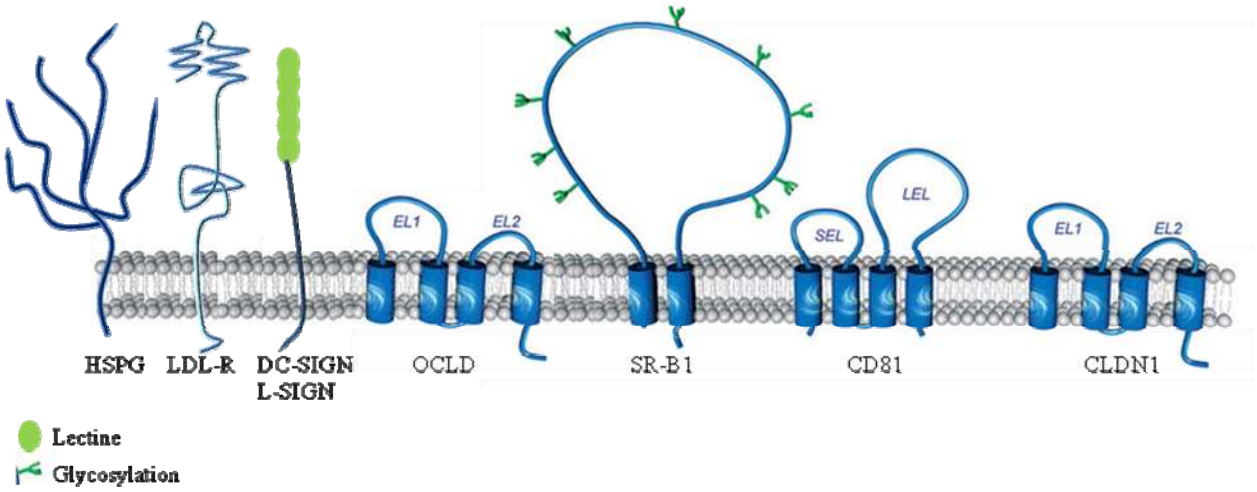


Figure 7 : Représentation schématique des récepteurs putatifs du VHC (D'après Helle, *Cellular and Molecular Sciences* et Ploss, *Nature* (Helle 2008; Ploss et al. 2009)

HSPG : héparane sulfate protéoglycane ; LDL-R : low density lipoprotein-receptor ; DC-SIGN : dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin ; L-SIGN : liver endothelial cell lectin ; OCLD : occludine ; SR-B1 : scavenger receptor B1 ; CD81 : tétraspanine CD81 ; CLDN1 : claudine 1.

3.1. Récepteurs putatifs, attachement et entrée virale

Par analogie avec les autres membres de la famille des *Flaviviridae* et les propriétés fonctionnelles connues des glycoprotéines d'enveloppe, le cycle viral du VHC débuterait par l'adsorption de la particule virale sur la cellule cible, par la fixation probable sur un ou plusieurs récepteurs membranaires, permettant l'entrée du virus (Dubuisson et al. 2008). Les lipoprotéines associées au VHC jouent un rôle majeur dans ce phénomène.

- Récepteurs putatifs :

Plusieurs molécules de surface cellulaire sont considérées comme récepteurs ou corécepteurs essentiels pour l'entrée virale (CD81, SR-B1, CLDN-1, occludine). De plus, les lectines DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intracellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin) et L-SIGN (spécifique du foie mais non de l'hépatocyte) sont impliquées dans l'attachement, et les glycosaminoglycanes (comme les héparanes sulfates) et les récepteurs aux LDL (LDL-R) sont impliqués dans l'attachement à la cellule et l'entrée virale. Nous reviendrons sur certains d'entre eux au chapitre II (Figure 7).

<u>CD81</u> :

Membre de la famille des tétraspanines, CD81 est une protéine membranaire non glycosylée de 236aa (26kDa), exprimée de façon ubiquitaire et impliquée dans de nombreuses fonctions cellulaires (adhésion cellulaire, mobilité, activation cellulaire, transduction du signal). Elle comporte 4 domaines transmembranaires (TM), 2 boucles extracellulaires (une petite, Small Extracellular Loop ou SEL, et une grande, Large Extracellular Loop ou LEL), la LEL étant responsable de l'interaction avec E2, ainsi que des domaines Ct (C-terminal) et Nt (N-terminal) intracellulaires (Pileri et al. 1998). La liaison CD81 LEL/sE2 semble spécifique de l'espèce (Flint et al. 2006). Plusieurs études suggèrent une action post-attachement de CD81 (Cormier et al. 2004). En effet, cette molécule induirait une relocalisation actine-dépendante du complexe E2/CD81 au niveau des contacts cellule-cellule, ce qui déclencherait une cascade de signalisation importante pour l'entrée virale (Brazzoli et al. 2008). Enfin, en 2008, Meuleman a pu démontrer pour la première fois le rôle indispensable de CD81 dans l'infection par le VHC *in vivo* à l'aide du modèle de souris transgéniques uPA-SCID (Meuleman et al. 2008).

SR-B1/Cla1 :

Exprimé dans de nombreuses cellules de mammifères et plus particulièrement dans le foie et les tissus stéroïdogènes, le récepteur « scavenger » SR-B1 (Cla1 pour la forme humaine) est une glycoprotéine de 509aa (60kDa), appartenant à la superfamille CD36, comportant 2 domaines cytoplasmiques, 2 domaines TM et 1 large boucle extracellulaire hautement glycosylée. C'est un récepteur multi-ligand pour de nombreuses classes de lipoprotéines (HDL, LDL, VLDL, LDL oxydée, LDL acétylée) (Trigatti et al. 2000) et pour le VHC (Scarselli et al. 2002). Il contient en effet des sites distincts de liaison pouvant interagir indépendamment avec leurs ligands respectifs. SR-B1 a une fonction essentielle dans l'entrée du cholestérol provenant des HDL et VLDL dans le foie. Notre équipe a montré le caractère essentiel des lipoprotéines riches en ApoB telles que les VLDL dans l'interaction du VHC avec le récepteur SR-B1. En outre, cela nous a menés à envisager l'existence d'une voie dépendante des lipoprotéines pour l'entrée virale, en présence même d'anticorps neutralisants tels que des anti-E2 (Maillard et al. 2006). De plus, des études ont démontré la possibilité d'une liaison E2/SR-B1 (espèce spécifique) par l'intermédiaire du HVR-1 (Hyper Variable Region) d'E2, ainsi que l'existence d'une coopération entre SR-B1 et CD81 dans l'entrée virale (Dreux et al. 2009).

Protéines de jonctions serrées (CLDN et Occludine) :

Les jonctions serrées sont des composants majeurs des complexes d'adhésion cellule/cellule.

- CLDN-1, membre de la famille des Claudines, est exprimée dans tous les tissus épithéliaux, mais plus particulièrement dans le foie. Cette protéine de 211aa comporte 2 boucles extracellulaires, 4 segments TM et 3 domaines intracellulaires. Un domaine hautement conservé dans la première boucle extracellulaire (EL1) semble impliqué dans l'entrée du VHC (Evans et al. 2007). L'interaction du virus avec CLDN-1 a lieu après migration du complexe SR-B1/CD81 au niveau des jonctions serrées. Il a récemment été montré que 2 autres membres de la famille des Claudines médient aussi l'entrée virale : CLDN-6 et 9 (Zheng et al. 2007).
- L'occludine est une protéine de 60kDa comprenant 2 boucles extracellulaires, avec des domaines Ct et Nt cytoplasmiques. Elle participe à la fois à l'adhésion cellule/cellule et à l'ancrage du complexe de jonction au cytosquelette. Des études récentes ont démontré l'interaction directe de l'occludine avec E2, facilitant ainsi l'entrée virale par les jonctions serrées des hépatocytes (Liu et al. 2009; Ploss et al. 2009).

Glycosaminoglycanes (GAGs) :

Les GAGs sont des chaines de polysaccharides linéaires sulfatés exprimés en grand nombre à la surface de la cellule. Ce sont les principaux composants des héparanes sulfates protéoglycanes (HSPG). Des expériences ont été effectuées *in vitro* : la séparation de surnageants de cultures cellulaires infectées sur colonne d'héparine a montré que les particules virales se lient à l'héparine, un homologue des HSPG. De plus, des expériences de pré-incubation de cellules avec de l'héparine ou de l'héparinase I, qui dégrade l'héparine et les domaines hautement sulfatés des HSPG, ont démontré que ces molécules permettent la liaison du VHC aux cellules. Les HSPG présentent une faible affinité pour le virus mais leur nombre en fait un point d'ancrage majeur à la surface cellulaire. Les héparanes sulfates agissent probablement comme récepteur primaire concentrant le virus à proximité du ou des récepteurs plus spécifiques de forte affinité ou facilitent l'interaction du virus avec d'autres molécules impliquées dans son entrée dans la cellule (Morikawa et al. 2007).

Lectines de type C :

Ce sont des protéines de membrane de type II, homotétramériques, de la famille des lectines de type C, contenant un domaine de reconnaissance des carbohydrates dans leur région Ct extracellulaire. Ce domaine se lie aux carbohydrates des virus de manière calcium dépendante. DC-SIGN et L-SIGN ne sont pas exprimées à la surface des hépatocytes : DC-SIGN est exprimée dans les cellules de Küppfer, les cellules dendritiques et les lymphocytes, et L-SIGN dans les cellules endothéliales sinusoïdales du foie. Ces molécules peuvent avoir une fonction de récepteurs de capture, capables de concentrer et transmettre le virus aux cellules permissives et peuvent ainsi jouer un rôle dans l'infection et le tropisme cellulaire (Cormier et al. 2004).

Le récepteur aux asialoglycoprotéines, présent principalement dans le foie, a également été évoqué comme candidat possible dans l'entrée du VHC dans la cellule (Saunier et al. 2003) mais son rôle n'a pas été confirmé sur le modèle HCVcc (Cocquerel et al. 2006).

Récepteur aux lipoprotéines de faibles densités (LDL-R) :

C'est une glycoprotéine de 839aa (120kDa), majoritairement exprimée dans le foie, reconnaissant notamment les apolipoprotéines B100 et E et permettant l'entrée des lipoprotéines de faible densité (LDL, VLDL) dans la cellule. Le LDL-R est ainsi responsable de l'assimilation des lipoprotéines par le foie. L'interaction virus/LDL-R s'effectuerait par

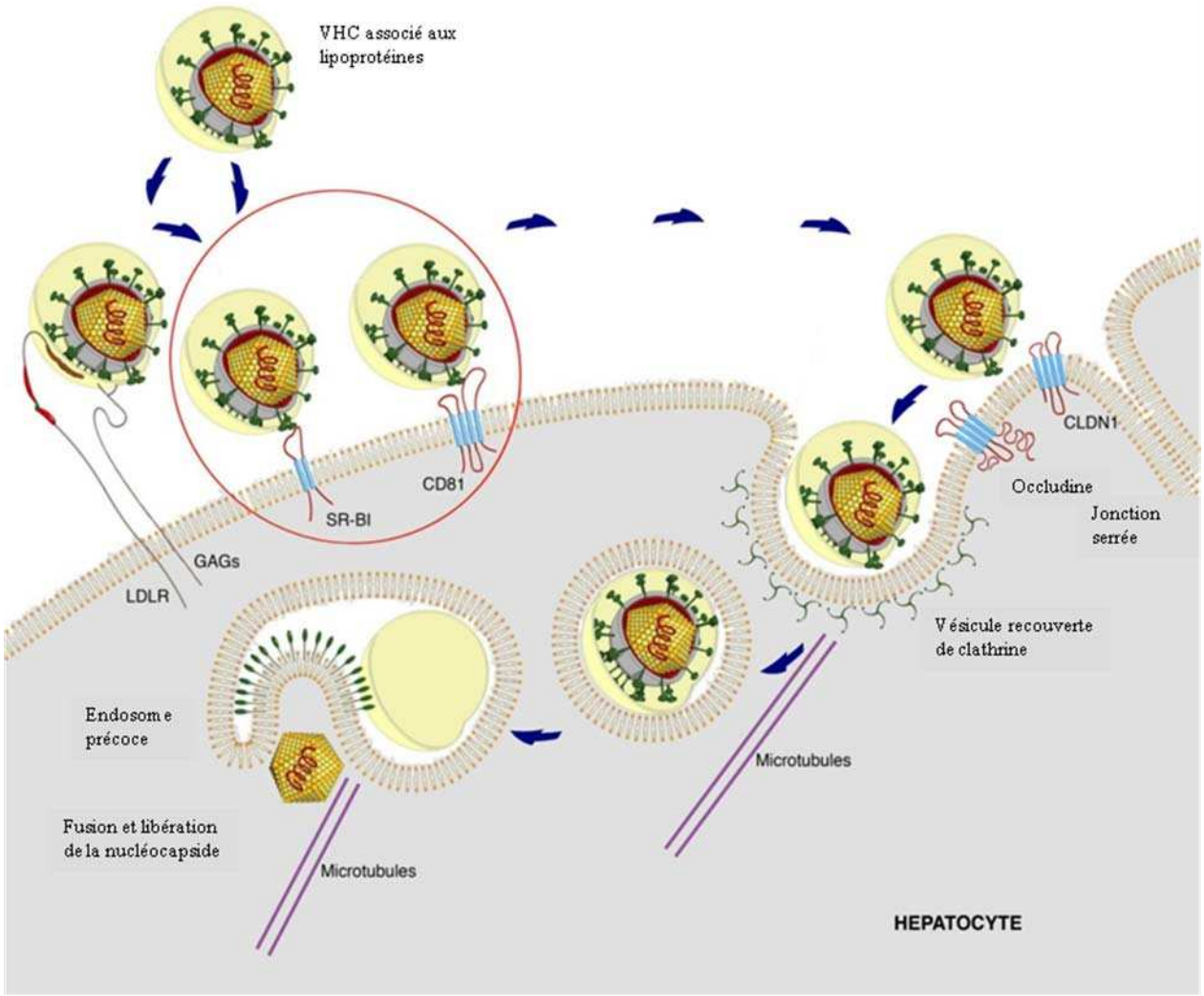


Figure 8 : Modèle d'entrée virale du VHC. D'après Budkowska, *Polish Journal of Microbiology* (Budkowska 2009)

l'intermédiaire des LDL et des VLDL associées au VHC, ce qui conduirait à l'internalisation du virus par le LDL-R (Agnello et al. 1999; Andre et al. 2002; Molina et al. 2007).

- Attachement et entrée virale :

Le VHC existe sous différentes formes chez les patients : associé ou non à des lipoprotéines de faible densité, enveloppé ou non enveloppé (Figure 5). Les données actuelles suggèrent que les évènements conduisant à l'entrée virale et à une infection productive suivent un processus multi-étapes impliquant à la fois des facteurs viraux et cellulaires. Les principales molécules médiant l'entrée virale dans les hépatocytes sont CD81, SR-B1 et les protéines de jonctions serrées Claudine et Occludine (Budkowska 2009). A celles-ci s'ajoutent les HSPG et/ou le LDL-R comme facteurs potentiels pouvant jouer un rôle dans l'attachement du virus à la cellule. L'entrée du virus dans la cellule est probablement initiée par l'interaction entre les lipoprotéines associées au VHC (principalement les VLDL) et des récepteurs ou molécules de liaison aux lipoprotéines : LDL-R, SR-B1, HSPG. Le VHC interagit ensuite avec CD81, un récepteur « post-entrée », formant un complexe avec SR-B1. L'équipe de Kapadia a montré dans le système de culture cellulaire HCVcc qu'il est impératif que CD81 et SR-B1 fonctionnent de manière coopérative pour initier l'infection par le VHC. De plus, l'entrée cellulaire médiée par CD81 est en partie dépendante du cholestérol membranaire (Kapadia et al. 2007). CD81 déclenche des cascades de signaux essentiels à l'entrée virale. Le virus est ensuite transféré aux protéines de jonctions serrées Claudine 1, 6 ou 9 et occludine (Figure 8) (Budkowska 2009). Bien que toutes les molécules médiant l'entrée et l'infection de la cellule par le VHC soient ubiquitaires et qu'aucune d'entre elles ne soit spécifique des cellules hépatiques, seuls les hépatocytes humains ont la capacité d'exprimer tous les facteurs cellulaires requis pour l'accomplissement du cycle viral.

Il semble donc que d'autres facteurs permettant l'entrée virale et déterminant l'hépatotropisme restent à découvrir. Un exemple de régulateur négatif est la protéine récemment mise en évidence EWI-2wint (Figure 9). Cette dernière est une protéine de type immunoglobuline capable d'interagir avec CD81. Elle est exprimée dans tous les types cellulaires à l'exception des hépatocytes. Cette mobilisation de CD81 l'empêche de lier des glycoprotéines d'enveloppe et donc d'initier l'entrée virale (Rocha-Perugini et al. 2008; Schuster 2009).

De façon similaire aux autres *Flaviviridae*, il a été montré (modèles HCVpp et HCVcc) que le VHC entre dans la cellule *via* une endocytose clathrine-dépendante. Les glycoprotéines d'enveloppe médient la fusion pH-dépendante de la particule virale avec la membrane des

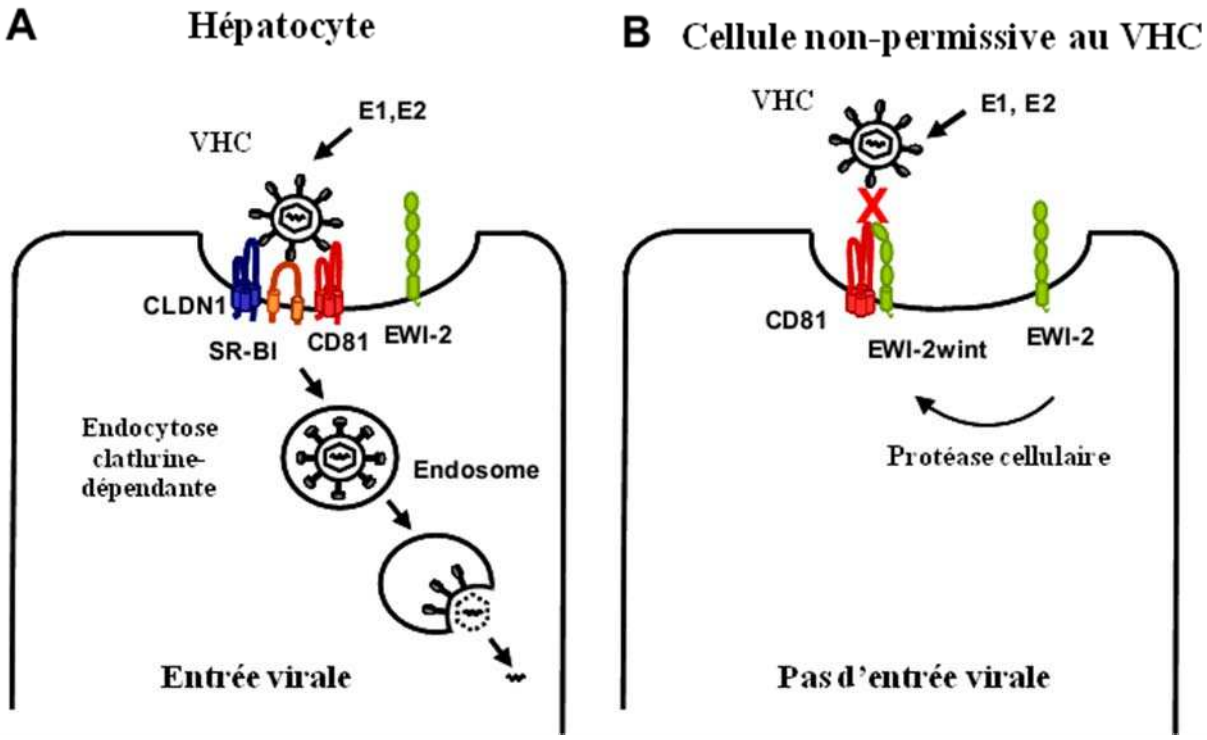


Figure 9 : Modèle d'inhibition de l'entrée virale par EWI-2wint. D'après Schuster, *Journal of Hepatology* (Schuster 2009)

A. Entrée du VHC dans une cellule permissive (hépatocyte)

B. Inhibition de l'entrée du VHC dans des cellules non-permissives par EWI-2wint. EWI-2wint est généré par le clivage de EWI-2 par une protéase cellulaire et va inhiber l'interaction entre les glycoprotéines d'enveloppe du VHC et CD81.

Cependant, il est essentiel de noter que le modèle utilisé dans cette étude est HCVpp et ne prend donc pas en compte les lipoprotéines.

endosomes précoces (pH optimal : 5,5). La nucléocapside est libérée dans le cytoplasme et le virus échappe donc à la voie de dégradation des lipoprotéines (Blanchard et al. 2006; Meertens et al. 2006; Perrault 2009). Notre équipe a montré que le VHC naturel peut reconnaitre de façon directe SR-B1 et entrer dans la cellule *via* ce dernier. Nous avons également mis en évidence l'interaction du VHC avec le récepteur *via* les lipoprotéines associées aux particules virales (Maillard et al. 2006). Les lipoprotéines ont donc un impact majeur sur l'attachement et l'entrée du VHC dans la cellule.

3.2. Traduction et maturation

Suite à la libération de l'ARN viral dans le cytoplasme de la cellule, la traduction coiffe-indépendante est réalisée par la machinerie de traduction cellulaire. L'IRES de la région 5'NC, à travers ses domaines II et III, permet le positionnement de la sous unité 40S du ribosome directement au niveau du codon initiateur inclus dans sa structure. La synthèse protéique, qui a lieu au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique (RE), est ensuite réalisée grâce au recrutement de multiples protéines cellulaires. La polyprotéine, pendant et après sa synthèse, est la cible de clivages effectués par des protéases soit cellulaires, soit virales. Les protéines virales structurales sont les premières à être maturées par les signal peptide peptidase et signal peptidase du RE. La protéine de capside est retrouvée au niveau des gouttelettes lipidiques et les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 sont ancrées à la membrane du RE. Les protéines non structurales, issues des clivages par NS2/NS3 et NS3/4A vont, quant à elles, à l'exception de NS2, former le complexe de réplication (Suzuki et al. 2007; Gastaminza et al. 2008). Nos travaux ont montré le caractère crucial du réseau de microtubules dans le cycle viral du VHC dans les étapes post-entrée du virus dans la cellule. Ces données seront discutées dans l'article 3 de la partie résultats (Roohvand et al. 2009).

3.3. Réplication

Le mécanisme exact de la réplication du VHC n'est pas connu en détail, mais un modèle a pu être proposé du fait des connaissances sur la réplication d'autres virus à ARN (alpha-, picorna-, flavi-, arteri-, rubi- ou bromovirus) (Mackenzie 2005). Elle se déroulerait à la membrane du RE, au niveau d'un compartiment membranaire particulier nommé « Membranous Web », et serait réalisée par le complexe de réplication viral constitué de NS5B, NS5A, NS4B et NS3/4A (Moradpour et al. 2007).

Comme la traduction, la réplication est régulée par l'action d'éléments de séquence en cis situés dans les régions non codantes. La réplication commence à l'extrémité 3' de l'ARN génomique aboutissant à la synthèse du brin de polarité négative. La région 3'NC contient 2 éléments essentiels à la réplication : la séquence poly (U/C) et les 3 tiges-boucles de la région X (structure en trèfle). La région poly (U/C) permet la fixation de la PTB (Polypyrimidine Tract Binding protein) qui se fixe également dans la région 5'NC : cela conduit à l'hypothèse selon laquelle la PTB circulariserait le génome en formant un pont entre les deux extrémités. Le processus de réplication est supposé se faire en deux temps, tous les deux catalysés par NS5B : dans un premier temps, le brin de polarité positive sert de matrice pour la synthèse du brin de polarité négative ; dans un second temps, le brin de polarité négative sert également de matrice pour la production de plusieurs brins d'ARN de polarité positive. Il existe un déséquilibre en faveur de la synthèse du brin de polarité positive qui est utilisé comme matrice pour obtenir de nouveaux intermédiaires de réplication (phase de réplication), pour générer les protéines virales (phase de traduction) et aussi pour la formation de nouvelles nucléocapsides. Il est important de noter que le complexe de réplication aurait un rôle protecteur contre les RNases et les protéases (Suzuki et al. 2007). De plus, des études ont montré une forte interaction de certaines protéines du complexe de réplication (NS3/4A et NS5A) avec la tubuline, composant principal des microtubules, et l'actine. Le réseau de microtubules est d'une importance cruciale pour le maintien du RE et du « membranous web » dans le cytoplasme. C'est donc un déterminant majeur de l'assemblage et du fonctionnement du complexe de réplication (Lai et al. 2008; Wolk et al. 2008). Enfin, l'importance du rôle des lipoprotéines et des lipides dans la réplication a été démontré (cf 2ème partie, chapitre IV) (Meunier et al. 2008).

3.4. Morphogénèse et sécrétion

Là encore le mécanisme exact de cette étape du cycle viral est peu connu. Un modèle a tout de même été suggéré, reposant encore en grande partie sur les connaissances du cycle viral des autres *Flaviviridae* et sur les propriétés intrinsèques des protéines virales.

La protéine de capside peut d'une part s'auto-assembler et d'autre part lier l'ARN viral. Elle forme des nucléocapsides icosaédriques qui semblent pouvoir être libérées comme telles de la cellule (Maillard et al. 2001; Suzuki et al. 2007). Cette capacité de la protéine de capside à lier l'ARN serait aussi le signal pour le passage de la réplication à l'assemblage du virion. La capside étant, de plus, capable d'interagir avec E1, il a été proposé que le bourgeonnement du

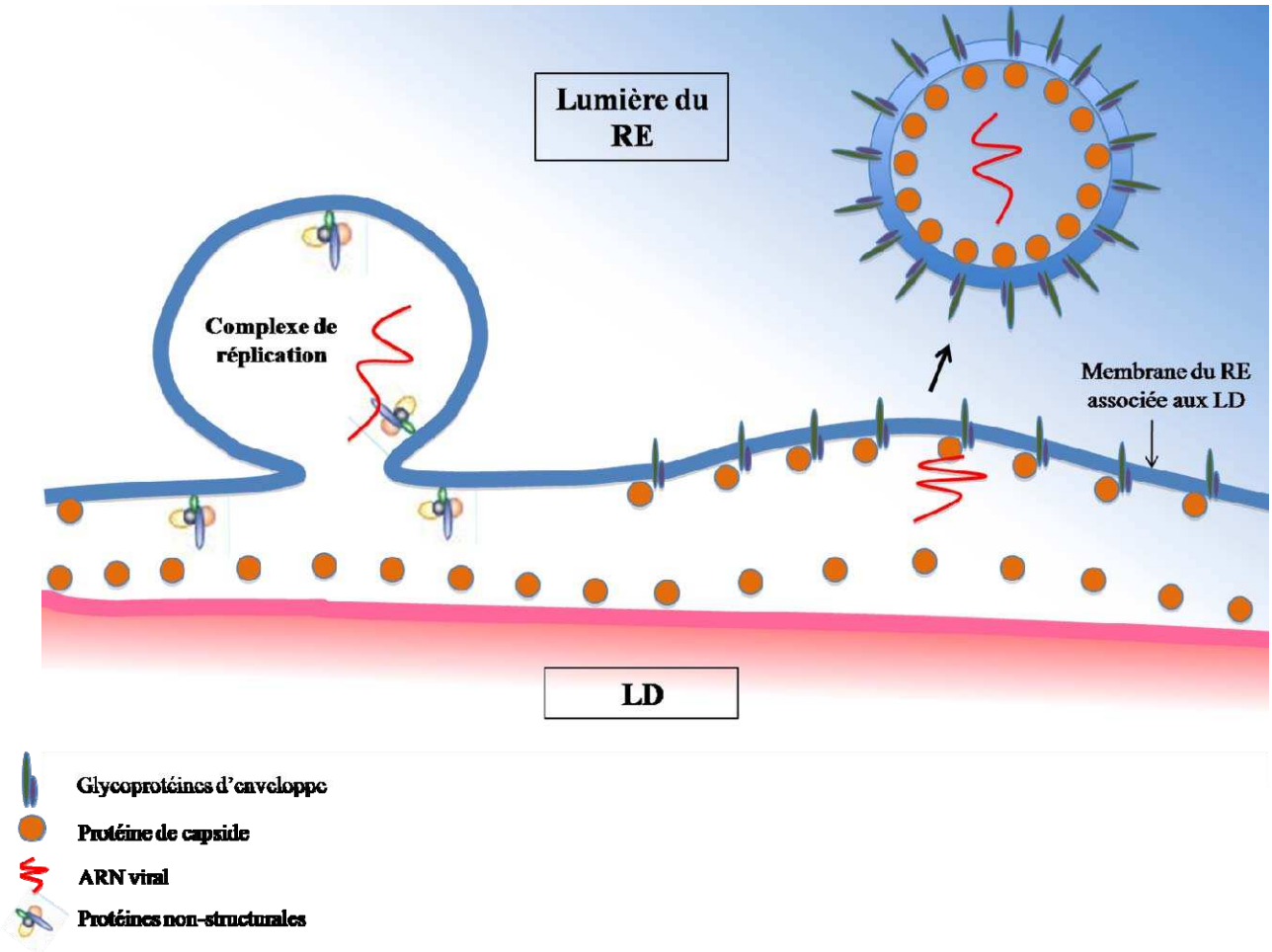


Figure 10 : Modèle de morphogénèse du VHC. D'après Miyanari, *Nature* (Miyanari et al. 2007)

VHC ait lieu au niveau des membranes du RE où sont insérées les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2. Le virion est ensuite libéré de la cellule. Il faut cependant préciser que ce mécanisme d'assemblage du virion au niveau de la membrane du RE n'a pas pu être prouvé dans le système de culture cellulaire HCVcc, ce qui sous-tend que de nombreux évènements du cycle viral du VHC restent encore à élucider (Moradpour et al. 2007; Suzuki et al. 2007). Miyanari a démontré avec le système réplicon la présence de toutes les protéines virales du VHC dans le « membranous web », lieu où le génome viral est majoritairement retrouvé et répliqué dans la cellule, suggérant ainsi que des protéines non-structurales forment en partie le complexe de réplication et que ce dernier peut jouer un rôle important, non seulement dans la réplication, mais aussi dans toute la morphogénèse du virus (Figure 10) (Miyanari et al. 2007).

Il a également été montré que la protéine de capside recrute protéines non-structurales et complexes de réplication au niveau des membranes des LD, ce qui est critique pour la production de particules virales infectieuses (Miyanari et al. 2007).

Enfin, des études récentes ont affirmé que les mécanismes de morphogénèse et sécrétion du VHC requièrent l'association du virus aux lipides, celui-ci suivant la voie de sécrétion des VLDL (Chang et al. 2007; Huang et al. 2007).

3.5. Transmission intercellulaire de l'infection

Les voies de transmission intercellulaire du VHC sont encore mal définies. En culture de cellules Huh7, l'infection se propage en formant des foyers croissants de cellules infectées (Zhong et al. 2005). Il a été montré que l'infection pouvait se propager par contact direct entre cellules cultivées à forte densité, *via* un mécanisme dépendant de la CLDN-1 mais indépendant du CD81 (Timpe et al. 2008). Cependant, une autre étude a montré que dans un modèle de co-culture, il n'y avait pas de passage de l'infection de cellule à cellule de façon indépendante des récepteurs (Russell et al. 2008). Très récemment, une étude a montré que sur des coupes de biopsies de patients infectés, les cellules infectées formaient des « clusters », suggérant l'existence *in vivo* d'une infection de proche en proche (Liang et al. 2009).

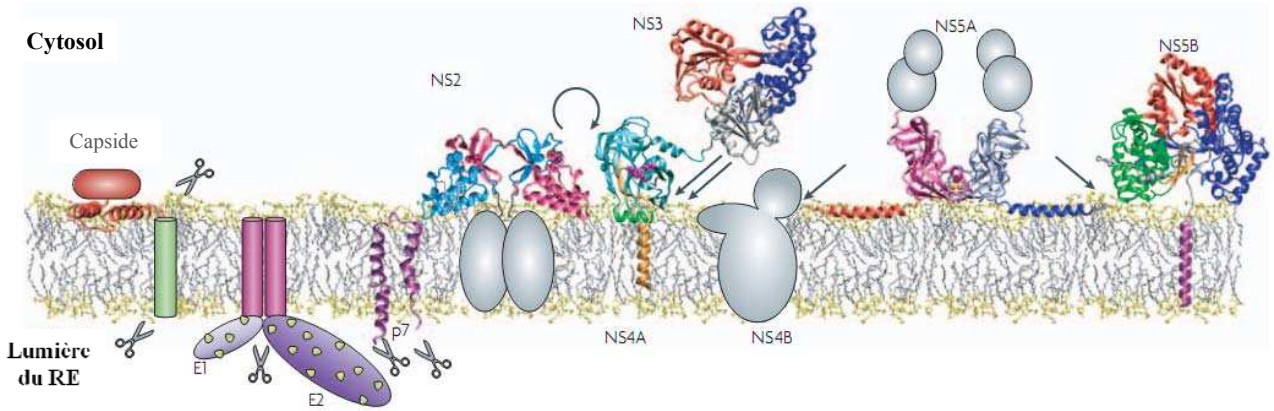


Figure 11 : Structure et association membranaire des protéines du VHC. D'après Moradpour, *Nature* (Moradpour et al. 2007)

Les ciseaux indiquent un clivage par une signal peptidase du RE, à l'exception du côté cytosolique où le clivage de la protéine de capside a lieu grâce à une signal peptide peptidase. La flèche circulaire représente le clivage par la protéase NS2/NS3 et les flèches droites la maturation par le complexe protéasique NS3/4A. Les protéines dont la structure n'est pas connue sont représentées par des sphères ou des cylindres.

4. Protéines virales

L'ARN du VHC est constitué d'une seule phase ouverte de lecture qui code une polyprotéine virale clivée par la suite par des protéases cellulaires et virales pour générer 3 protéines structurales et 7 protéines non structurales (Figure 11 et tableau 1) (Penin et al. 2004; Moradpour et al. 2007).

4.1. Protéines structurales

Ces protéines sont maturées au cours de la synthèse de la polyprotéine sous l'action de peptidases cellulaires.

- Protéine de capside

La protéine de capside est une phosphoprotéine basique, synthétisée sous une forme immature de 23kDa. Sa maturation requiert l'intervention de deux protéases cellulaires. Une signal peptidase clive tout d'abord au niveau de la jonction peptide signal/E1, libérant la partie Nt de E1 et donnant la forme immature de la protéine de capside. Sa forme mature de 21kDa est générée après clivage du peptide signal situé en Ct par une signal peptide peptidase (SPP) du RE (Targett-Adams et al. 2008). Elle est constituée d'un domaine I hydrophile qui comprend les aa 1 à 120, d'un domaine II qui se termine par l'aa 179 et dans sa forme immature d'un domaine III, TM, correspondant au peptide signal (Figures 12 et 13) (Dubuisson 2007; Suzuki et al. 2007; Boulant et al. 2008). Elle présente de nombreuses fonctions décrites ci-dessous (McLauchlan 2000 et 2009).

<u>Rôle dans la morphogénèse du virus</u> :

Les 75 premiers aa correspondent à un domaine basique de la protéine impliqué dans l'interaction avec l'ARN. Elle semble avoir des capacités d'oligomérisation par sa région Nt grâce à un domaine d'interaction homotypique riche en tryptophane. De plus, elle semble interagir avec la glycoprotéine E1 par son extrémité Ct (Lo et al. 1996).

Sa localisation cellulaire est principalement cytoplasmique, où elle s'associe aux membranes du RE par son domaine Ct, ou à des gouttelettes lipidiques (ou lipid droplets LD) (Bartenschlager et al. 2004; Miyanari et al. 2007), mais elle a aussi été retrouvée dans le noyau d'hépatocytes de patients infectés (Falcon et al. 2003) et au niveau des membranes

Protéine	Poids moléculaire (kDa) *	Fonction
Capside	21	Liaison à l'ARN ; nucléocapside
E1	31-35	Glycoprotéine d'enveloppe ; association avec E2
E2	70	Glycoprotéine d'enveloppe ; liaison aux récepteurs ; association avec E1
P7	7	Canal ionique
NS2	21	Composant de la protéase NS2-NS3; coopération avec NS3 pour le clivage de la jonction NS2/NS3
NS3	69	Domaine Nt protéase ; domaine Ct NTPase/hélicase : liaison ARN/ADN et ARN/ARN ; coopération avec NS4A pour la maturation de la polyprotéine
NS4A	6	Cofacteur de la protéase NS3 ; maturation de la polyprotéine ; rôle dans l'inhibition de la réponse immune innée ; rôle dans la carcinogénèse
NS4B	27	Induit des altérations membranaires et par conséquent la formation du « membranous web » associé au RE durant la réplication ; inhibition du trafic cellulaire entre le RE et l'appareil de Golgi
NS5A	56-58	Phosphoprotéine ; rôle essentiel dans la réplication (régulation) ; interaction avec de nombreuses voies de signalisation cellulaire ; inhibition de cycle cellulaire et de l'apoptose
NS5B	68	ARN polymérase ARN-dépendante ; associée au RE et au « membranous web » ; rôle essentiel dans la réplication ; rôle oncogénique ; rôle dans l'échappement viral

*Estimation par SDS-PAGE

Tableau 1 : Protéines virales et leur fonction dans le cycle viral du VHC. D'après Dubuisson, *World Journal of Gastroenterology* et Thomson, *British Medical Bulletin* (Dubuisson 2007; Thomson 2009)

mitochondriales en contact avec le RE (Rouille et al. 2006; Roingeard 2008). Une séquence putative de localisation nucléaire a été identifiée comme pouvant conduire la protéine de capside dans le noyau. Cependant, il est à noter que l'interaction de la capside avec les LD n'a été prouvée que dans le modèle de culture cellulaire HCVcc (Figure 14). Cette association pourrait jouer un rôle de « plateforme » concentrant les éléments viraux et cellulaires essentiels à l'assemblage des particules virales infectieuses (Miyanari et al. 2007). Les autres localisations cellulaires de la protéine de capside n'ont pu être confirmées, de même que sa liaison aux membranes du RE ou aux glycoprotéines d'enveloppe.

Rôle dans le métabolisme cellulaire :

La protéine de capside interagit avec de multiples protéines cellulaires, conduisant à d'importantes altérations de la signalisation de la cellule hôte (Figure 15).

Elle possède un rôle central dans la pathogénèse de par ses propriétés oncogéniques pouvant s'expliquer par sa capacité à moduler l'expression de nombreux facteurs de transcription et de gènes régulateurs de la croissance cellulaire (Moriya et al. 1998; Ray et al. 2000).

De manière paradoxale, la protéine de capside pourrait également être impliquée soit dans le maintien de l'infection chronique (rôle anti-apoptotique), soit dans les dommages hépatiques (rôle pro-apoptotique), par son interaction avec des récepteurs impliqués dans la mort cellulaire (Sheikh et al. 2008).

D'autre part, notre équipe a montré que la protéine de capside peut interagir avec le fragment Fc des immunoglobulines G (IgG), donc mime le rôle d'un récepteur Fcγ, ce qui pourrait constituer un moyen pour le virus d'interférer avec la réponse immunitaire de l'hôte et confère donc à la protéine un rôle immunomodulateur (Maillard et al. 2004). De plus, par son association avec un récepteur du complément, gC1qR (Large et al. 1999; Kittlesen et al. 2000), la protéine de capside entraine une diminution de la prolifération des lymphocytes T, ainsi que par l'inhibition de la production d'IL2 et d'oxyde nitrique (NO) par les macrophages (Lee et al. 2001).

Enfin, la protéine de capside affecte le métabolisme lipidique tel qu'en atteste la stéatose observée chez les souris transgéniques. Cet effet peut être du à son association aux gouttelettes lipidiques entrainant leur accumulation dans le cytoplasme.

Des travaux ont montré que la protéine de capside inhibe la MTP (Microsomal Transfer Protein) (Perlemuter et al. 2002), ce qui diminue la sécrétion de VLDL et permettrait donc d'expliquer la faible concentration plasmatique de VLDL souvent rencontrée chez des patients chroniquement infectés ainsi que l'apparition de la stéatose associée au VHC

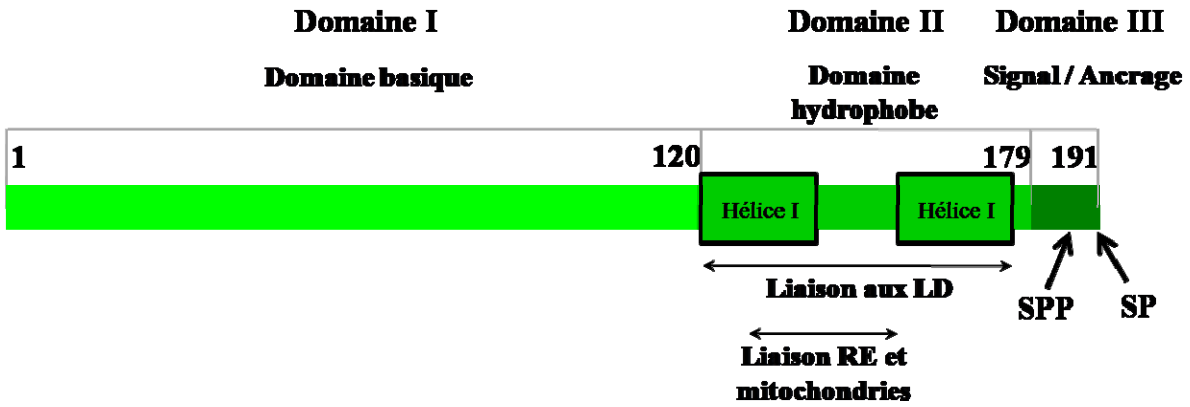


Figure 12 : Représentation des domaines linéaires de la protéine de capside. D'après Miyanari, *Nature* (Miyanari et al. 2007)

Le domaine I possède une séquence favorisant sa pénétration alors que le domaine II hydrophobe induit sa rétention à la membrane. Le domaine III est transmembranaire.
SPP : signal peptide peptidase
SP : signal peptidase

(Roingeard 2008). *In vitro*, on a montré que la lipoprotéine ApoA2, qui entre dans la composition des HDL, interagit avec la capside, ce qui favorise la sécrétion de protéine de capside par la cellule (Sabile et al. 1999). Son interaction avec des complexes protéiques cellulaires intervenant dans l'organisation du cytosquelette a également été démontré (Tsao et al. 2006).

- Protéine F

Cette protéine a été identifiée en 2001 et nommée protéine F (Frameshift) ou ARFP (Alternative Reading Frame Protein) et des études ont montré qu'il s'agit en réalité d'une protéine issue soit d'un décalage de phase de lecture (-2/+1) au niveau d'une région riche en A située entre les codons 9 et 11 de la séquence codant la capside, soit d'une traduction à partir d'AUG internes, soit d'un « glissement » transcriptionnel (Walewski et al. 2001; Vassilaki 2003; Branch et al. 2005; Ratinier et al. 2009). Elle est localisée au niveau des membranes du RE périnucléaire (Roussel et al. 2003; Xu et al. 2003). Cette protéine est très instable, car rapidement dirigée vers une voie de dégradation par le protéasome, mais l'existence d'anticorps dirigés contre celle-ci dans le sérum de patients suggère qu'elle peut aussi être sécrétée lors de l'infection (Xu et al. 2003). Récemment elle a été impliquée dans la transformation hépatocytaire (Ma et al. 2008). Ce pouvoir oncogénique rappelle fortement et appuie celui de la protéine de capside (Dubuisson 2007).

- Glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2

Les glycoprotéines d'enveloppe E1 (35kDa) et E2 (70kDa) sont des protéines transmembranaires de type I. Elles sont ancrées dans la membrane du RE, au niveau duquel se fait leur maturation suite à l'action d'une signal peptidase du RE. Elles possèdent un long ectodomaine Nt, fortement glycosylé, dirigé vers la lumière du RE, et un court domaine Ct TM (Rouille et al. 2006). Les domaines TM de ces deux protéines sont multifonctionnels puisqu'ils ancrent les glycoprotéines à la membrane du RE et contiennent des séquences essentielles pour leur hétérodimérisation et leur « rétention » dans le RE. Leur processus de maturation et repliement est très complexe. Il dépend de leur forte glycosylation (6 sites sur E1 et 11 sur E2), ainsi que du recrutement d'une protéine chaperonne réticulaire, la calnexine. En effet, dans leur forme fonctionnelle, les deux protéines s'assemblent en un hétérodimère non covalent E1-E2. L'association avec E2 favoriserait le repliement d'E1 et la calnexine permettrait à l'ensemble d'adopter une conformation correcte (Brazzoli et al. 2005).

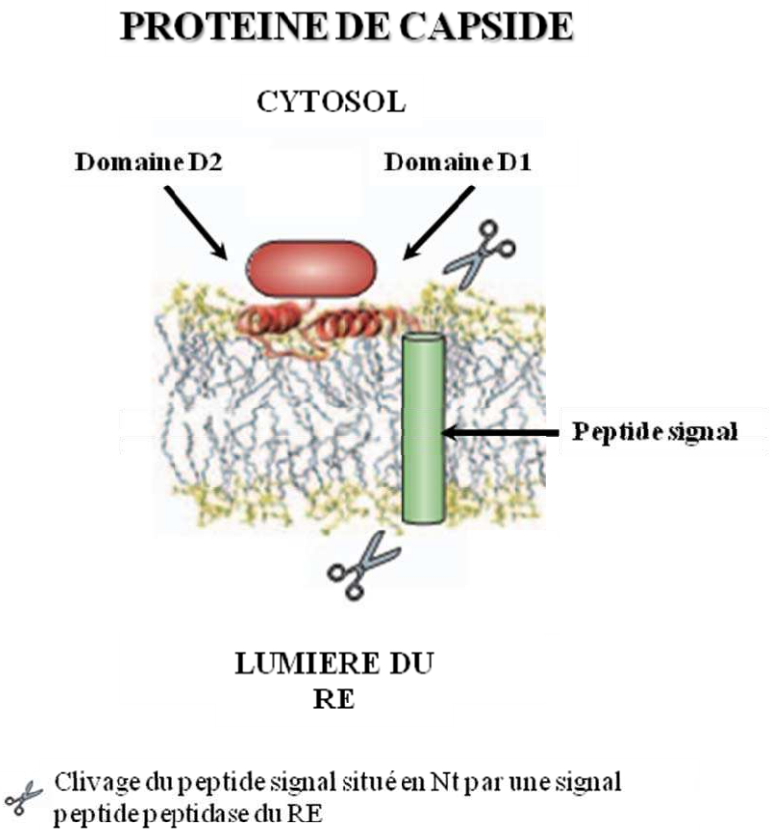


Figure 13 : Schéma de la protéine de capside du VHC. D après Moradpour, *Nature* (Moradpour et al. 2007)

Cette figure présente la structure schématique de la protéine de capside du VHC, avec son domaine D1 hydrophile qui comprend les 120 aa Nt et son domaine D2 qui se termine par l'aa 179. La forme mature de la protéine est générée après clivage du peptide signal situé en Nt par une signal peptide peptidase du RE.

Ces protéines jouent un rôle majeur dans l'entrée virale. La localisation de l'hétérodimère E1-E2 à la surface des virions putatifs en a fait des candidats d'intérêt pour rechercher des récepteurs au virus. A l'aide de la forme soluble d'E2 (sE2) et de pseudo particules virales, il a pu être mis en évidence que la tétraspanine CD81, le récepteur scavenger SR-B1, les héparanes sulfates, les lectines liant les mannoses DC-SIGN et L-SIGN et les récepteurs aux LDL sont impliqués dans l'interaction VHC/cellule. L'importance relative de ces récepteurs putatifs est exposée dans la partie sur le cycle viral (Pileri et al. 1998; Flint et al. 2006; Brazzoli et al. 2008).

Ces deux protéines seraient aussi impliquées dans la fusion du virion avec la cellule cible car elles partagent de fortes homologies structurales avec les protéines de fusion de type II. Néanmoins, leur forte glycosylation rend difficile l'obtention d'une bonne résolution de la structure cristallographique qui pourrait pourtant permettre une meilleure compréhension des mécanismes de fusion (Voisset 2004).

Enfin, elles sont une cible majeure des anticorps neutralisants lors de la réponse immune de l'hôte. Le VHC a par conséquent développé des mécanismes pour contourner cette défense : des régions à hypervariabilité génétique ont été identifiées dans la partie Nt de E2 (HVR1 et HVR2 pour Hyper Variable Region) ; elles joueraient un rôle majeur dans l'échappement du virus au système immunitaire. Du point de vue de l'entrée virale, la région HVR1 de E2 semble impliquée dans l'interaction virus/SR-B1. La conservation de certains aa de HVR1 et 2 suggère en outre un rôle de la conformation de cette région dans le mécanisme d'attachement et d'entrée du virus dans la cellule (Dreux et al. 2009).

Il est aussi important de noter que la coexpression d'E1 et E2 peut également conduire à la formation d'agrégats liés par des ponts disulfures qui pourraient jouer un rôle dans la pathogénèse (Dubuisson 2007; Suzuki et al. 2007).

Enfin, récemment, des données ont montré l'importance du rôle des lipoprotéines entourant le VHC, et plus particulièrement le rôle crucial joué par E2 dans le processus de fusion du virus aux membranes cellulaires. En effet, il a été montré que les fractions virales les plus légères (modèle HCVcc) sont aussi les plus fusogènes. Une interaction protéines-lipides au sein de la particule virale semble donc favorable à la fusion (Haid et al. 2009).

- Protéine P7

Cette protéine est un petit peptide de 63aa (7kDa) majoritairement hydrophobe, constitué de 2 hélices α TM, séparées par un court segment hydrophile. Ses domaines Nt et Ct sont orientés vers la lumière du RE. La protéine P7, de façon analogue à une viroporine, formerait des

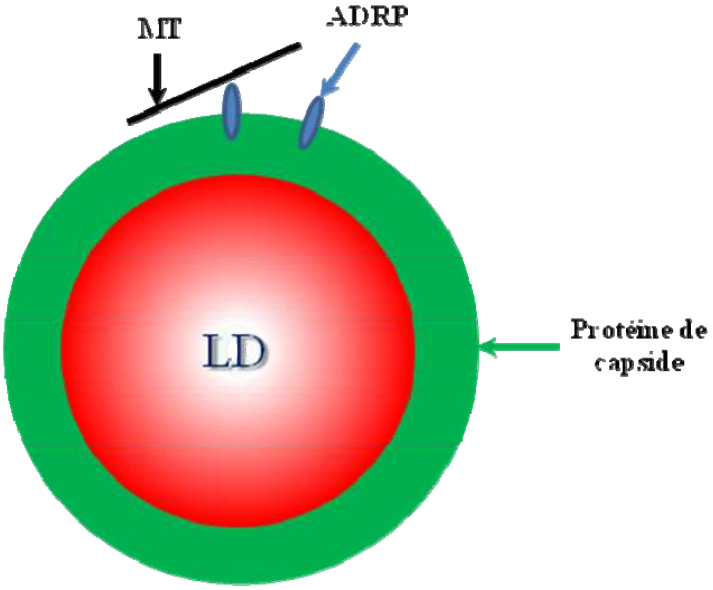


Figure 14 : Association de la protéine de capside du VHC aux gouttelettes lipidiques ou lipid droplets (LD). D'après Boulant, *Traffic* (Boulant et al. 2008)

La protéine de capside s'associe aux LD. Ces dernières peuvent interagir avec les microtubules (MT) grâce à la présence de l'ADRP. Cela permet aux LD, et par conséquent à la protéine de capside associée, de se mouvoir vers le noyau, de façon à rapprocher la protéine de capside des membranes du RE modifiées ou « membranous web », où a lieu la réplication de l'ARN du VHC.

canaux ioniques membranaires en s'associant en hexamères. L'utilisation de clones infectieux défectifs pour P7 chez le chimpanzé suggère un rôle essentiel de cette protéine dans l'infection, dû à l'altération de la perméabilité membranaire, facilitant ainsi la sécrétion de particules virales infectieuses. La protéine P7 semble également moduler le clivage au niveau des sites E2/P7 et P7/NS2 (Sakai et al. 2003; Suzuki et al. 2007; Brohm et al. 2009).

4.2. Protéines non structurales

La maturation des protéines non structurales dépend des protéines virales et particulièrement de NS3 qui forme des complexes ayant une activité protéase. NS2 s'associe avec NS3 et coupe la jonction NS2/NS3 par sa fonction autoprotéase. NS3 va ensuite s'associer à NS4A pour former la protéase NS3/4A qui est responsable de la maturation de toutes les autres protéines non structurales.

- NS2

NS2 est une protéine hydrophobe de 23kDa, intégralement insérée dans la membrane du RE. Elle forme avec la partie Nt de NS3 une cystéine protéase auto-catalytique. La jonction p7/NS2 est clivée par une signal peptidase du RE, alors que NS2 et NS3 sont séparées par l'activité protéase zinc-dépendante du complexe NS2/NS3. NS2 participe à la maturation de la polyprotéine virale et si elle n'est pas essentielle à la formation du complexe de réplication du virus, elle a un rôle crucial dans la formation des particules virales. NS2 aurait également un rôle inhibiteur de l'apoptose. Son action inhibitrice sur la transcription de gènes cellulaires pourrait aussi être impliquée dans la chronicité de la maladie. Il est intéressant de noter que la durée de vie de cette protéine est courte, donc difficilement détectable dans le sérum de patient, car elle est orientée vers une dégradation protéasomale (Dubuisson 2007; Suzuki et al. 2007).

- NS3 et NS4A

NS3 est une protéine multifonctionnelle de 70kDa, possédant des activités sérine protéase dans sa région Nt et ARN hélicase/NTPase à son extrémité Ct (présence d'un motif DExH/D). Elle se lie avec une forte affinité à l'ARN double brin et ouvre les structures secondaires par hydrolyse de l'ATP. La présence de son cofacteur NS4A (6kDa) est néanmoins indispensable pour que cette activité soit optimale. NS3 ne possède pas de domaine TM : elle est ancrée du

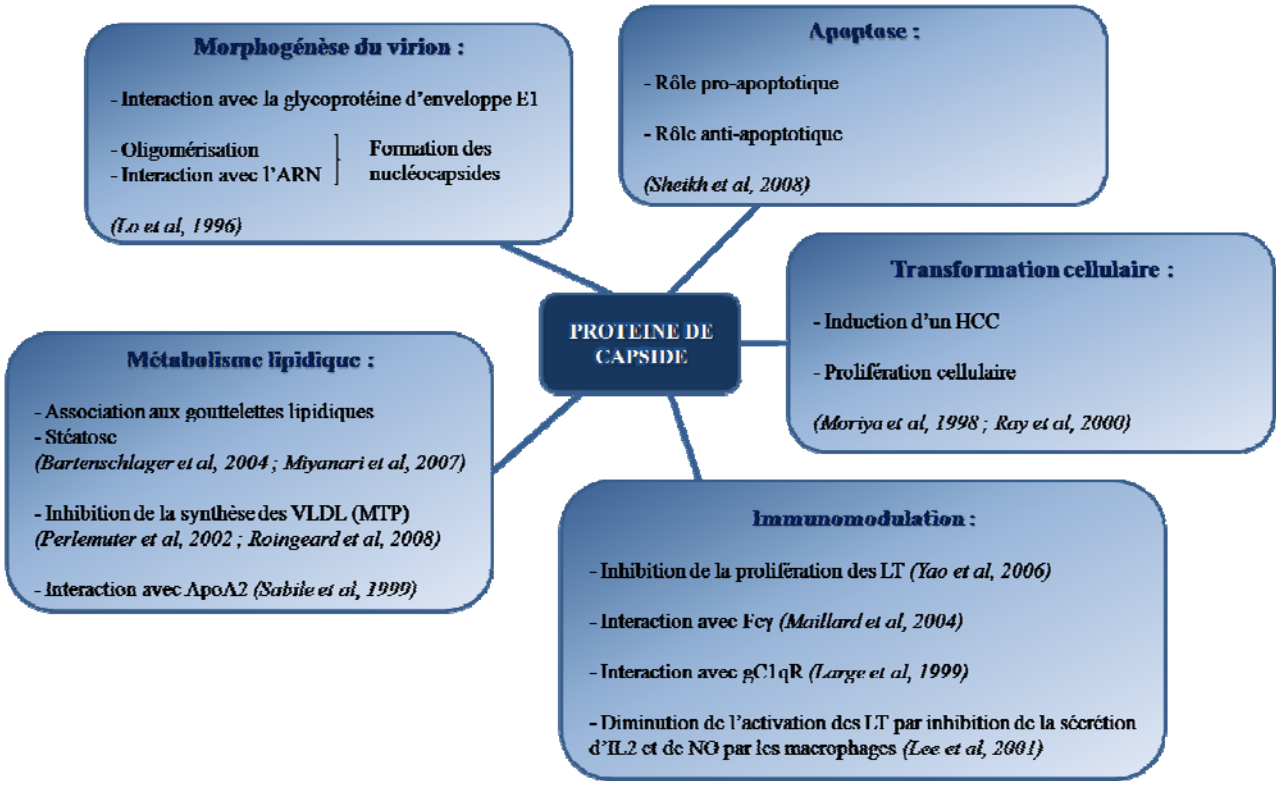


Figure 15 : Fonctions connues de la protéine de capside du VHC

Ce schéma présente les différentes fonctions connues de la protéine de capside du VHC, dans la morphogénèse du virus et dans le métabolisme cellulaire.

côté cytoplasmique de la membrane du RE, par son association en un complexe non covalent avec l'extrémité Nt de NS4A. NS3/4A, par son activité protéase, est responsable du clivage des jonctions NS3/4A, NS4A/NS4B, NS4B/NS5A et NS5A/NS5B, et cette activité est essentielle à la formation du complexe de réplication. Outre son rôle dans le cycle viral, NS3/4A interfère avec plusieurs voies de signalisation cellulaire ce qui lui confère un rôle dans la carcinogénèse et dans l'échappement du virus à la réponse immunitaire (Pang et al. 2002; Dubuisson 2007; Suzuki et al. 2007).

- NS4B

NS4B est une protéine hydrophobe de 27kDa, possédant 4 domaines TM et une hélice amphipatique en Nt, qui serait impliquée dans le réarrangement lipidique et la formation du réseau membranaire du RE associé au complexe de réplication. Elle possède un site de fixation du GTP, lié à une activité GTPase. Ce site serait indispensable à la réplication de l'ARN du VHC. NS4B aurait aussi la capacité de moduler l'activité de NS5B et serait également impliquée dans le trafic des protéines entre le RE et l'appareil de Golgi. De plus, elle aurait un rôle dans l'échappement du virus à la réponse immunitaire et empêcherait également la mort cellulaire induite par le VHC (Dubuisson 2007; Suzuki et al. 2007).

- NS5A

Cette protéine de 56kDa, associée à la membrane du RE grâce à une hélice amphipatique Nt, joue un rôle crucial dans le recrutement du complexe de réplication. En effet, cette localisation à la membrane du RE est essentielle à la formation du complexe de réplication, qui est dépendante de l'association de NS5A avec une protéine membranaire du RE, hVAP-A (human Vesicle-Associated Membrane Protein-Associated Protein). Elle interagit avec NS5B et serait capable de fixer les extrémités 5' et 3' non codantes de l'ARN du VHC (Macdonald 2004; Dubuisson 2007). NS5A est exprimée sous 2 formes : une forme « constitutivement » phosphorylée, et une forme hyperphosphorylée (58kDa). La signification fonctionnelle de cette modification est peu connue à l'heure actuelle mais semble être impliquée dans la réplication du virus (Evans et al. 2004). NS5A tient un rôle prépondérant dans la formation des particules virales ainsi que dans la pathogénèse du VHC par ses actions sur le cycle cellulaire et par sa participation à l'échappement du virus à la réponse immunitaire de l'hôte (Macdonald 2004; Suzuki et al. 2007).

- NS5B

Cette protéine de 68kDa, la dernière codée par le VHC, est une ARN polymérase ARN dépendante. Elle est essentielle pour la réplication de l'ARN. NS5B est associée à la membrane du RE par une hélice TM Ct. Son analyse cristallographique montre qu'elle a des caractéristiques comparables à celles d'autres polymérases : le domaine catalytique évoque une main droite avec 3 sous-domaines : la « paume », les « doigts » et le « pouce », la matrice ARN se glissant dans le sillon formé par les doigts repliés sur la paume. La liaison de la matrice ARN et l'initiation de la synthèse sont régulées par une structure flexible en épingle à cheveux pointant vers le site actif et une boucle Ct permettant de positionner correctement la matrice et d'empêcher les initiations internes. L'activité polymérase de NS5B est régulée par son interaction avec les protéines virales NS3 et NS5A et elle est aussi optimisée par l'association de NS5B avec les cyclophilines A et B (Pawlotsky et al. 2007; Flisiak et al. 2008). NS5B interagit avec des protéines cellulaires impliquées dans la régulation de voies de signalisation cellulaire importantes et contribue ainsi à la pathogénèse de par une action oncogénique et un rôle dans l'échappement à la réponse immunitaire. Le rôle crucial de NS5B dans la réplication virale en fait une cible de choix pour la thérapie et de nombreuses molécules la ciblant sont en cours de développement (Dubuisson 2007; Suzuki et al. 2007).

III. Modèles expérimentaux

La compréhension de la pathologie et l'étude du cycle viral du VHC ont longtemps été limitées par le manque de petit modèle animal et de modèles cellulaires efficaces.

1. Modèles d'étude du VHC *in vitro*

Le VHC ayant pour cible les hépatocytes, il paraissait évident d'étudier son cycle infectieux au sein de ces cellules. Tout d'abord, Ito a démontré que les hépatocytes isolés d'un patient chroniquement infecté sont capables de répliquer le virus et de produire des particules infectieuses lorsqu'ils sont mis en culture (Ito et al. 1996). *In vitro*, les hépatocytes humains primaires et des lignées cellulaires d'hépatocarcinome telles que HepG2 peuvent être infectés par le sérum de patients, mais si ces cellules permettent la réplication du virus, elles ne

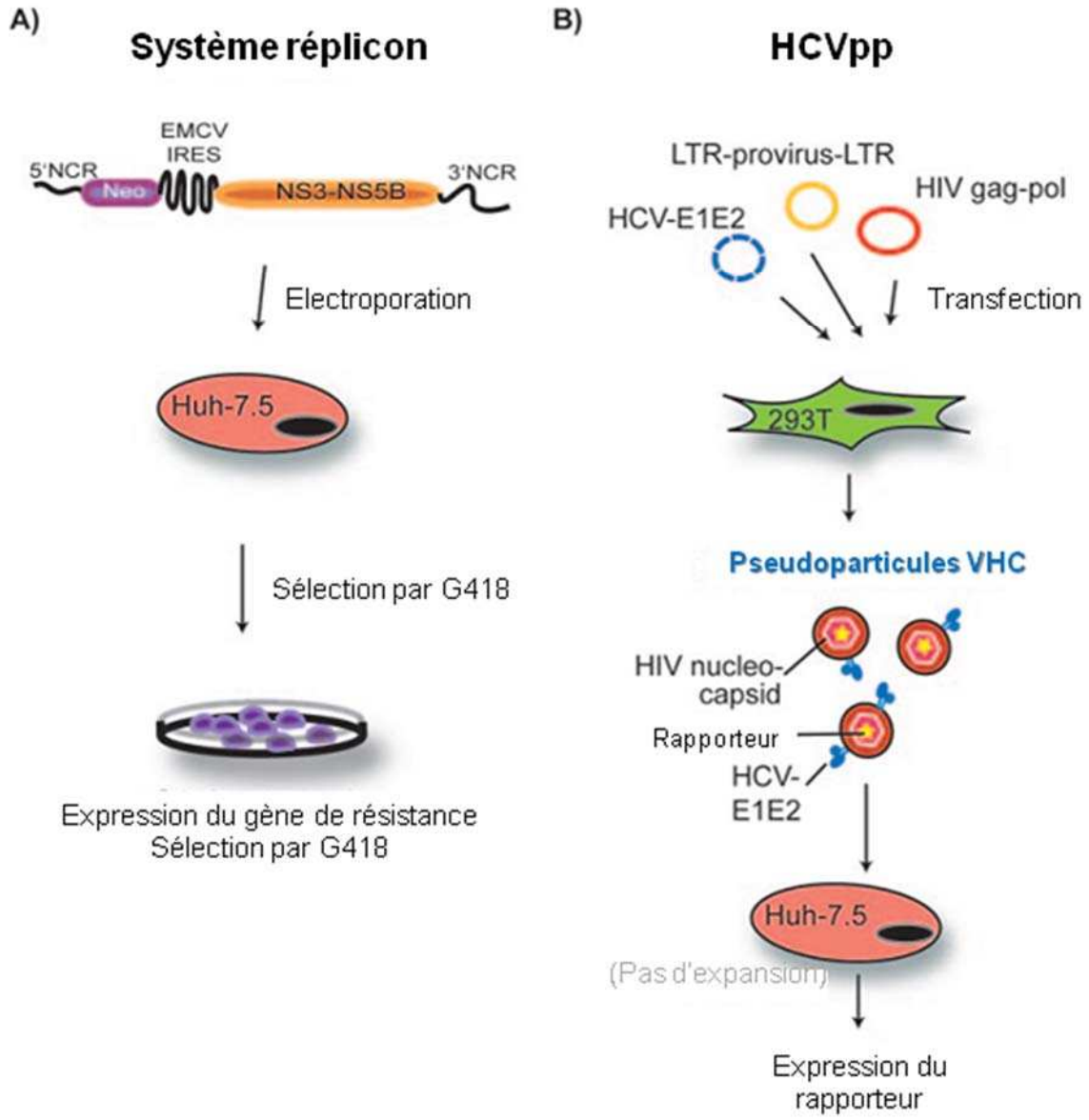


Figure 16 : Modèles *in vitro* d'étude du VHC. D'après Tellinghuisen, *Journal of Virology* (Tellinghuisen et al. 2007)

A. Modèle réplicon
B. Modèle de pseudoparticules

produisent pas de particules virales et ne sont donc pas un modèle efficace de propagation de l'infection (Pietschmann et al. 2002).

1.1. Modèle réplicon

Ce modèle a permis d'étudier principalement l'étape de réplication du VHC, ainsi que les interactions du VHC avec l'hôte et la réponse antivirale (Figure 16 A).

Le réplicon est constitué d'ARN bicistroniques construits de la manière suivante : le premier cistron est composé du gène de résistance à la néomycine (Neo^r) sous dépendance de l'IRES du VHC, et le second cistron comprend la séquence codante du VHC exprimée sous contrôle de l'IRES fort du virus de l'encéphalomyocardite (EMCV).

Techniquement, cet ARN réplicon introduit par transfection dans des lignées hépatocytaires est pris en charge par la machinerie cellulaire : le complexe de traduction cellulaire, en se fixant sur le deuxième IRES (EMCV), permet la synthèse des protéines non structurales qui formeront le complexe de réplication. Ce dernier se fixe sur l'extrémité 3' du brin de polarité positive et initie une réplication de l'ARN réplicon, qui permettra dans un premier temps d'obtenir un brin de polarité négative ; cet ARN servira ensuite de matrice pour l'obtention d'un ARN de polarité positive, utilisé pour produire d'autres formes réplicatives du VHC et aussi traduit par la machinerie cellulaire. Cette traduction permet donc l'expression du gène de résistance à la néomycine et seuls les clones exprimant ce gène seront sélectionnés avec de la généticine (G418). Ainsi les clones maintenus en culture sous pression de G418 expriment le gène Neo^r et répliquent donc efficacement le réplicon (Lohmann et al. 1999; Tellinghuisen et al. 2007). Ce système, très utile, notamment dans une approche thérapeutique, pour le développement d'antiviraux, ne permet cependant pas une réplication productive du virus.

1.2. Pseudo particules virales

Des systèmes d'expression ectopique de protéines virales ont permis une grande avancée dans l'étude des mécanismes d'entrée du VHC (Figure 16 B). Les modèles d'expression de la protéine d'enveloppe E2 sous forme soluble, sE2, (sans région Ct permettant l'ancrage à la membrane) ont permis notamment d'identifier des récepteurs putatifs indispensables à l'entrée virale.

Les pseudoparticules sont également un système d'expression hétérologue de protéines virales. Ce système permet la formation de particules présentant des caractéristiques proches

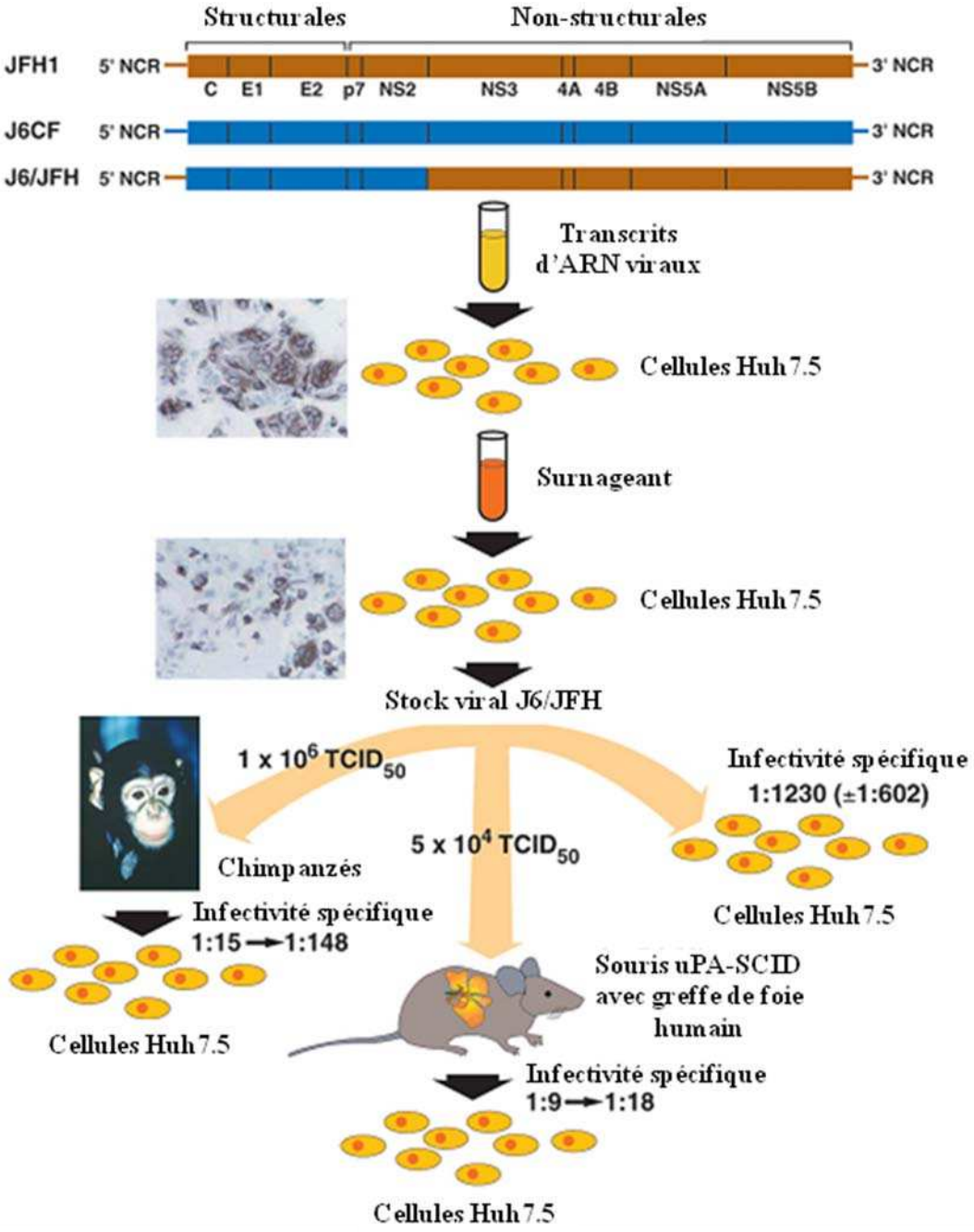


Figure 17 : Virus produit en culture cellulaire (HCVcc). D'après Bukh, *PNAS* (Bukh 2006)

Ce schéma représente les génomes du JFH-1, du J6 et du virus chimère J6/JFH-1. Les ARN sont introduits dans les cellules Huh7.5 par électroporation. Les surnageants de culture sont recueillis et servent à réinfecter des cellules Huh7.5 naïves afin de produire un stock viral à même d'infecter de nouvelles cellules Huh7.5, des chimpanzés ou des souris « humanisées ». L'infectivité spécifique en culture cellulaire est déterminée par le ratio titre infectieux / charge virale. Les particules infectieuses isolées des animaux ont un pouvoir infectieux plus important que les particules d'origine.

de celles des virions du VHC mais avec absence de capside et de lipoprotéines. Il a permis d'étudier les interactions avec les récepteurs du virus et a aussi aidé dans l'étude des anticorps neutralisants (Tellinghuisen et al. 2007).

Cependant, ces particules ne se répliquant pas, elles ne peuvent être utilisées pour l'étude du cycle infectieux du VHC.

Plusieurs modèles d'étude du VHC ont été proposés :

● Les particules produites en cellules d'insecte, ou VLP (virus like particles), à partir de baculovirus recombinants codant les protéines structurales virales : les VLP possèdent des caractéristiques morphologiques, physiologiques et antigéniques similaires à celles des virions isolés de patients.

● Les virus pseudotypés exprimant les protéines d'enveloppe, ce qui consiste en la génération de virus recombinants reposant sur la construction de génomes chimériques constitués des domaines extramembranaires de E1 et E2 du VHC et du domaine transmembranaire de la glycoprotéine G du virus de la stomatite vésiculaire (VSV).

● Les pseudoparticules virales (HCVpp), modèle ayant permis une avancée majeure dans l'étude de l'entrée du VHC, reposent sur l'utilisation de rétrovirus recombinants permettant la production de glycoprotéines d'enveloppe fonctionnelles et non modifiées. Ces HCVpp sont produites suite à la cotransfection de cellules 293T avec des vecteurs d'expression codant les protéines E1 et E2 du VHC et les protéines Gag-Pol du virus de la leucémie murine (MLV) ou du VIH et un génome rétroviral codant un gène rapporteur, pour détecter l'entrée productive des pseudoparticules. Ces HCVpp servent à infecter les cellules sensibles au VHC et semblent reproduire correctement les étapes précoces de l'infection, particulièrement les interactions avec les récepteurs CD81 et SR-B1 (Bartosch et al. 2003).

1.3. Modèles de culture cellulaire

L'année 2005 a été marquée par la description d'un système cellulaire permettant une infection productive du VHC *in vitro* avec sécrétion de particules virales infectieuses (Figure 17) (Wakita et al. 2005; Zhong et al. 2005; Lindenbach et al. 2006).

L'isolat VHC de génotype 2a a été isolé en 2003 d'un patient japonais atteint d'une hépatite fulminante JFH-1 (Japanese Fulminant Hepatitis I) et caractérisé sous sa forme sous-génomique comme étant capable de se répliquer efficacement dans plusieurs types cellulaires sans aucune adaptation. Le génome complet du JFH-1 se réplique efficacement et permet la sécrétion de particules virales après transfection des cellules Huh7.

Ces particules virales ou HCVcc (pour HCV cell culture), de 55nm de diamètre et de densité 1,15-1,17g/ml, présentent des caractéristiques morphologiques communes avec les virions déjà analysés (Wakita et al. 2005). Cependant, les titres viraux produits sont peu élevés et diminuent fortement au cours du passage des cellules.

Ce système a donc été amélioré, tout d'abord par l'utilisation d'une lignée cellulaire plus permissive, les cellules Huh7.5, mais aussi par la construction de génomes chimères de génotype 2a (notamment J6(C/NS2)-JFH-1(NS3/NS5)). En utilisant des lignées dérivées des cellules Huh7.5, les Huh7.5.1, encore plus permissives, il a été obtenu des titres viraux plus conséquents et un maintien du taux d'ARN intracellulaire.

Enfin, l'intérêt majeur de ces HCVcc est qu'ils infectent les chimpanzés et les souris humanisées uPA-SCID, permettant des études plus approfondies sur le cycle viral et notamment l'entrée du VHC dans la cellule (Lindenbach et al. 2006).

2. Modèles d'étude du VHC *in vivo*

2.1. Chimpanzés

Le chimpanzé est le seul animal sensible à l'infection par le VHC et représente donc un hôte expérimental intéressant. La symptomatologie de la maladie est moins marquée et le taux de guérison supérieur à l'homme.

Ce modèle a permis l'identification du VHC (équipe de Houghton : Choo et al. 1989) et une meilleure compréhension des mécanismes d'infection et de guérison, ainsi que l'étude de la réponse immune lors de l'infection.

Cependant, les aspects éthiques, moraux et économiques qui accompagnent les études sur ces animaux en limitent l'utilisation. La recherche de petit modèle animal sensible au VHC est donc devenue une priorité.

2.2. Tupaïas

Ce petit animal apparenté aux primates est sensible à l'infection par le VHC. Cependant, la virémie est courte, les charges virales détectées sont faibles et aucun passage à la chronicité n'est observé (Xie et al. 1998; Zhao et al. 2002).

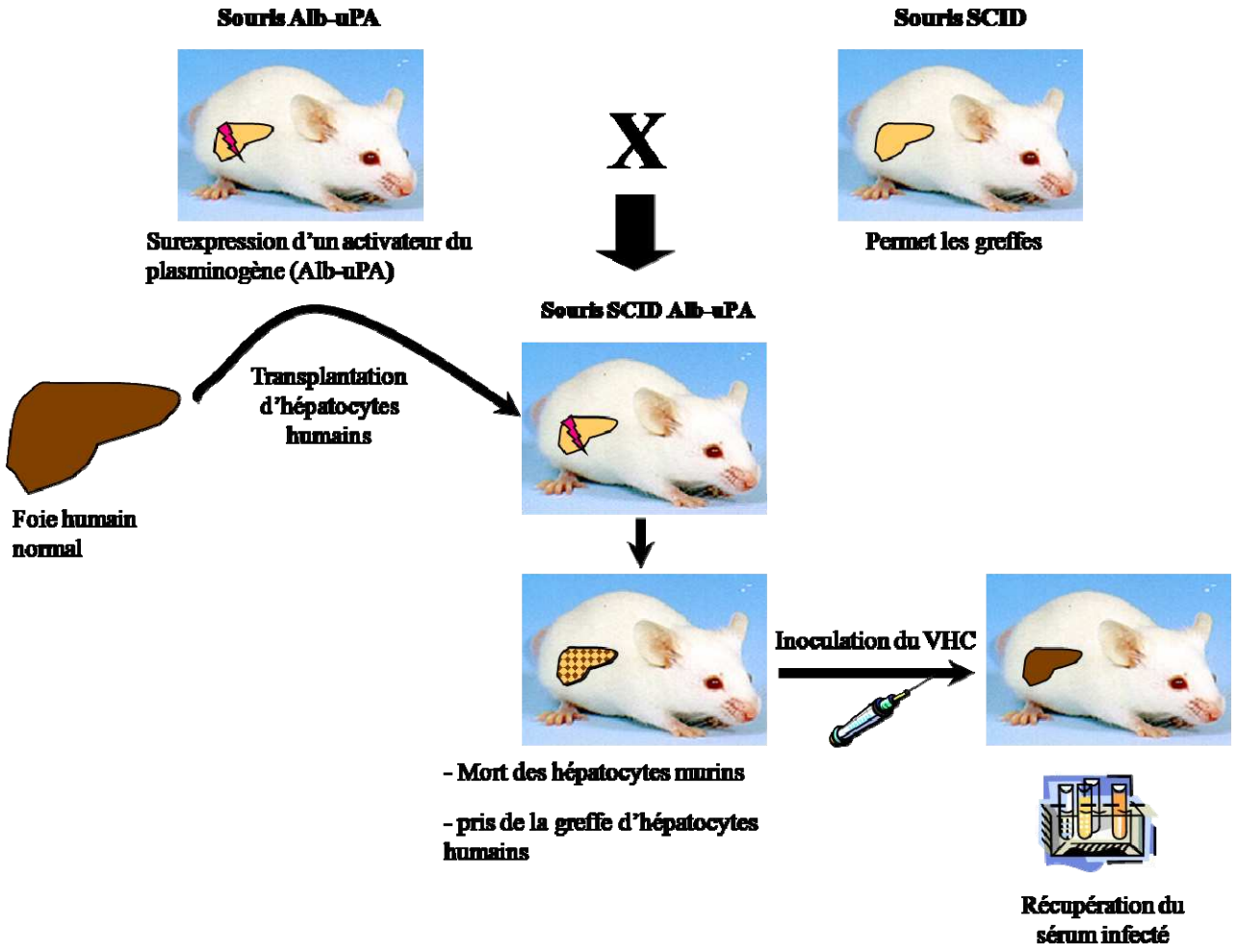


Figure 18 : Modèle de souris transgéniques « humanisées ». D'après Kremsdorf, *World Journal of Virology* et Meuleman, *Hepatology* (Kremsdorf 2007; Meuleman 2008)

2.3. Tamarins

Ces primates ne sont pas sensibles au VHC, mais au GBV-B, le virus le plus proche du VHC sur le plan de l'organisation génomique et de la séquence nucléotidique. Ce virus, également hépatotrope, se multiplie efficacement et de façon productive dans des cultures primaires d'hépatocytes de tamarins, mais là encore, aucun passage à la chronicité n'est observé. Cependant, cette homologie de séquence permet de construire des virus GBV-B chimères dont la réplication dépend de séquences du VHC, constituant ainsi un modèle de substitution intéressant pour l'étude de la réplication du VHC (Beames et al. 2000).

2.4. Souris transgéniques uPA-SCID avec greffe d'hépatocytes humains

Un modèle de souris dites « humanisées » a été développé (Figure 18) (Mercer et al. 2001; Meuleman et al. 2003; Meuleman et al. 2005; Meuleman 2008).

La surexpression dans le foie d'un activateur du plasminogène (Alb-uPA) provoque la mort des hépatocytes murins chez des souris transgéniques pour ce gène. Comme la souris Alb-uPA a été croisée avec une souris immuno-déficiente SCID (Severe Combined Immuno Deficiency), cela permet la greffe xénogénique d'hépatocytes humains et confère un avantage réplicatif aux hépatocytes transplantés. Plusieurs semaines après la transplantation, près de 85% du parenchyme hépatique est composé d'hépatocytes d'origine humaine. Ces hépatocytes humains sont vivants et bien organisés, formant l'architecture d'un foie normal et sécrètent au moins 22 protéines humaines, comme des apolipoprotéines et les protéines du complément (Meuleman et al. 2005). Les animaux transplantés sont sensibles à l'infection par le VHC provenant de patient infecté et peuvent donc être facilement infectés par le VHC. Ils restent virémiques pendant plusieurs mois. Les protéines ainsi que l'ARN viral sont détectés, démontrant ainsi une réplication active du virus dans les hépatocytes transplantés. Le fait que ces animaux soient immuno-déficients ne permet pas l'étude de l'immunité adaptative. Il est cependant intéressant de noter que l'inoculation d'anticorps neutralisants avant injection du VHC à ces souris protège ces dernières d'une infection par le virus (Meuleman 2008). Ce modèle est intéressant car il permet d'étudier la réplication virale mais aussi la transmission de l'infection à d'autres souris et les propriétés des particules virales.

L'ensemble de ces différents modèles a permis de très grandes avancées dans la compréhension du cycle viral du VHC. Dans cette thèse, le modèle de culture cellulaire HCVcc et les souris transgéniques uPA-SCID ont constitué un support d'envergure dans l'étude du lien entre le cycle viral du VHC et le métabolisme des lipoprotéines.

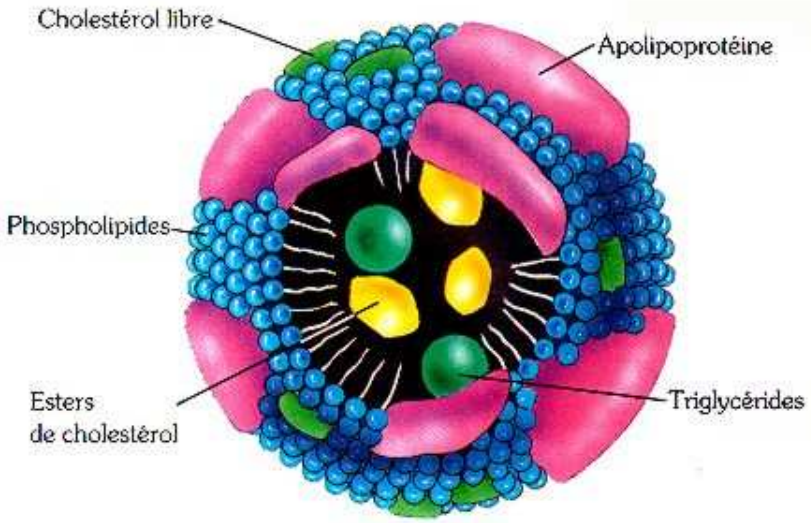


Figure 19 : Schéma d'une lipoprotéine

La lipoprotéine est une structure sphérique composée d'un cœur de cholestérol estérifié et de triglycérides (TG), entouré par une couche de phospholipides et de cholestérol libre dans laquelle sont encastrées des apolipoprotéines.

Le VHC et le métabolisme des lipoprotéines

Les particules virales naturelles, présentes dans le sérum de patients, sont très hétérogènes du fait de leur association à des lipoprotéines, aux anticorps et à la diversité des formes virales (cf chapitre I.2.). Les particules de densité les plus légères, correspondant à la densité des VLDL, sont aussi les plus infectieuses (Agnello et al. 1999; Andre et al. 2002 et 2005; Lindenbach et al. 2006). La protéine de capside et les apolipoprotéines (Apo) B et E sont détectées dans ces particules (Andre et al. 2002) et l'équipe de Chang a apporté la preuve que l'inhibition de l'assemblage des VLDL inhibait la production du VHC. Ils ont montré le caractère indispensable des ApoE et B dans l'infectiosité et la production du VHC en culture cellulaire, suggérant ainsi un lien étroit entre la production du VHC et l'assemblage des VLDL (Chang et al. 2007; Huang et al. 2007). Nous pouvons également noter que plusieurs candidats récepteurs pour le VHC sont des récepteurs aux lipoprotéines (SR-B1, LDL-R) (Agnello et al. 1999; Scarselli et al. 2002; Molina et al. 2007). Par ailleurs, plusieurs fonctions de la capside touchent le métabolisme des lipides. En effet, celle-ci favorise l'accumulation de lipides sous forme de gouttelettes (LD) dans le cytoplasme (McLauchlan 2000; Boulant et al. 2008), interagit avec l'ApoA2 qui entre dans la composition des HDL, et inhibe la Microsomal Triglyceride Tranfer Protein (MTP) qui participe à l'assemblage des VLDL (Sabile et al. 1999; Perlemuter et al. 2002). Il existe donc une étroite relation entre le VHC et le métabolisme des lipoprotéines.

Les lipoprotéines jouent donc un rôle essentiel dans les mécanismes d'entrée et d'infection de la cellule par le VHC et le virus de son coté influence le métabolisme des lipides cellulaires. C'est cette particularité du VHC qui a porté notre intérêt sur la LPL, ce qui a constitué la majeure partie de mon projet de thèse.

I. Les différentes classes de lipoprotéines

Le transport des lipides dans le sang se fait au moyen de lipoprotéines (Figure 19). Celles-ci sont des structures sphériques complexes, composées d'un cœur de cholestérol estérifié et de triglycérides (TG), entouré par une couche de phospholipides et de cholestérol libre dans laquelle sont encastrées des Apo. Elles sont caractérisées par leur taille, leur densité ainsi que

Lipoprotéines	Source	Densité (g/ml)	Protéine (%)	Triglycéride (%)	Phospholipide (%)	Ester de cholestérol (%)	Cholestérol libre (%)	Acides gras libres (%)
Chylomicron	Intestin	<0,95	1 à 2	85 à 88	8	3	1	0
VLDL	Foie	0,95 - 1,006	7 à 10	50 à 55	18 à 20	12 à 15	8 à 10	1
IDL	VLDL	1,006 - 1,019	10 à 12	25 à 30	25 à 27	32 à 35	8 à 10	1
LDL	VLDL / foie	1,019 - 1,063	20 à 22	10 à 15	20 à 28	37 à 48	8 à 10	1
HDL2	Intestin et foie	1,063 - 1,125	33 à 35	5 à 15	32 à 43	20 à 30	5 à 10	0
HDL3	Intestin et foie	1,125 - 1,21	55 à 57	3 à 13	26 à 46	15 à 30	2 à 6	6

Tableau 2 : Composition en lipides et protéines des lipoprotéines majeures. D'après Alonzi, *Expert Review of Proteomics* (Alonzi et al. 2008)

par leur composition en lipides et apolipoprotéines. Les Apo ont plusieurs rôles : elles peuvent être caractéristiques de certaines lipoprotéines, comme l'ApoB, qui est non-échangeable et présente en un seul exemplaire dans la lipoprotéine (LDL, VLDL) ou elles peuvent également être échangeables comme l'ApoA dans les HDL. Les Apo peuvent aussi avoir un rôle de cofacteurs enzymatiques, comme l'ApoC2 pour la LPL (Jong et al. 1999). Enfin, elles peuvent servir de ligands dans l'interaction avec les récepteurs des lipoprotéines, comme l'ApoB100 et l'ApoE pour le LDL-R ou l'ApoA1 pour le HDL-R (Botham 2008).
Les lipoprotéines riches en TG sont les chylomicrons et les VLDL. Ces lipoprotéines sont sécrétées par le foie (VLDL) et les intestins (chylomicrons) pour être retrouvées par la suite dans le sérum. Les principales lipoprotéines et leurs caractéristiques sont présentées dans le tableau 2.

1. Formation des VLDL

Les VLDL ont comme rôle majeur le transfert des lipides néosynthétisés du foie vers divers tissus extra hépatiques tels que les muscles ou les adipocytes. Elles sont synthétisées dans les hépatocytes. L'ApoB100, majoritaire dans les VLDL, est synthétisée au niveau du RE rugueux puis transférée vers la lumière du RE où s'effectue l'assemblage initial des VLDL, dites pré-VLDL, sous l'action de la MTP. Celles-ci sont ensuite transférées vers le RE lisse où elles s'associent à un cœur lipidique de TG et cholestérol pour former les VLDL (Alonzi et al. 2008; Andre 2008). L'ApoE agirait à un stade précoce de la formation des VLDL mais son action n'est pas précisément connue. Selon Wang, l'ApoE serait impliquée dans la mobilisation des LD présentes dans le RE et les gouttelettes serviraient à la lipidation des ApoB (Wang et al. 2007). La protéine de capside du VHC inhiberait l'activité de la MTP et par conséquent l'assemblage des VLDL, conduisant ainsi à l'accumulation de lipides dans le foie, ou stéatose induite par le VHC (Perlemuter et al. 2002). Les acides biliaires, qui sont des ligands de récepteurs nucléaires (Farnesoide X Receptor : FXR), ont une action sur le métabolisme lipidique en inhibant la lipogénèse et la production de VLDL et augmentent la réplication du VHC (Blasiole et al. 2007; Scholtes et al. 2008).

2. Formation des chylomicrons

Les chylomicrons sont les plus grosses lipoprotéines. Ils sont responsables de la mobilisation des lipides provenant de la digestion. Ils sont en effet formés par l'assemblage de TG et de

cholestérol provenant de la digestion, associé à l'ApoB48, au sein des cellules épithéliales intestinales. Une fois libérés dans la circulation sanguine, ils sont métabolisés dans de nombreux tissus (foie, adipocytes, muscles squelettiques) (Alonzi et al. 2008).
Le niveau d'ApoA4 affecterait la formation des chylomicrons : l'apport de lipides, en stimulant la production d'ApoA4, permettrait en effet l'expansion des chylomicrons naissants (Lopez-Miranda et al. 2007).

3. Les récepteurs aux lipoprotéines

Les récepteurs aux lipoprotéines sont classés en 2 familles : la famille du récepteur aux LDL, comprenant notamment le LDL-R, le VLDL-R et le LRP (LDL-receptor Related Protein) et les récepteurs « scavenger » dont le récepteur SR-B1. Bien que non spécifiques, les HSPG interviennent également dans l'entrée des lipoprotéines. Ici est effectué un bref résumé sur ces récepteurs déjà décrits au chapitre I.2.3.

3.1. La famille des récepteurs aux LDL

Le LDL-R, majoritairement exprimé par le foie, reconnait l'ApoB100, l'ApoE et la LPL. Son expression est régulée par la concentration de cholestérol dans le sang (Owen et al. 2009). Il permet l'entrée des LDL et VLDL dans la cellule par un mécanisme d'endocytose clathrine-dépendant. L'endosome fusionne alors avec un lysosome et les lipides sont relargués dans le cytoplasme. Il existe un mécanisme de recyclage de ce récepteur, pH-dépendant, et s'il n'est pas dégradé, le LDL-R est donc réadressé à la surface cellulaire (Fernandez-Borja et al. 1996). Avec le LRP, le LDL-R est responsable de l'assimilation des lipoprotéines par le foie. En effet, l'endocytose des LDL dans les tissus périphériques et des IDL dans les hépatocytes est médiée par le LDL-R, et celle de la LPL, de la HL et des remnants de lipoprotéines dans les hépatocytes par le LRP (Verges et al. 2004). Il est intéressant de noter l'existence d'une protéine chaperonne, RAP (Receptor Associated Protein), qui a pour rôle d'inhiber le LRP (Page et al. 2006).

3.2. Le récepteur scavenger SR-B1

SR-B1 est produit dans de nombreux tissus (tissus stéroïdogènes, poumons, tissus adipeux) et notamment le foie. C'est un récepteur multi-ligand, se liant aux LDL, aux LDL oxydées, aux LDL acétylées, mais aussi aux HDL et VLDL (Trigatti et al. 2000). Il est impliqué dans

Nom	Gène	Localisation	Description
Lipase dépendante des acides biliaires	?	Pancréas, lait maternel	Rôle dans la digestion des graisses
Lipase pancréatique	PNLIP	Sucs digestifs	Activité optimale de l'enzyme dans le tube digestif grâve à la colipase également sécrétée par le pancréas
Lipase lysosomale	LIPA	Lysosome	_
Lipase hépatique	HL ouLIPC	Endothélium	Action sur les lipides portés par les lipoprotéines circulants dans le sang, pour générer des LDL
Lipoprotéine lipase	LPL ou LIPD	Endothélium	Action dans le sang sur les TG portés par les VLDL ; récupération des AG par les cellules
Lipase hormone-sensible	LIPE	Intracellulaire	_
Lipase gastrique	LIPF	Sucs digestifs	Rôle dans la digestion des lipides chez l'enfant
Lipase endothéliale	LIPG	Endothélium	_
Lipase linguale	?	Sucs digestifs	_

Tableau 3 : Liste des diverses lipases humaines

l'efflux de cholestérol vers les HDL et aussi dans le captage sélectif du cholestérol, menant à son entrée dans le foie (Rhainds 2004; Hu et al. 2008).

3.3. Les HSPG

Il a été montré que les HSPG peuvent directement internaliser les lipoprotéines, *in vitro* comme *in vivo*. Cette clearance rapide débute par la séquestration des remnants de lipoprotéines dans l'espace de Disse, lieu où les HSPG sont très abondants. La liaison des remnants aux HSPG *via* la LPL et la HL a lieu du fait de leur fonction de pontage. S'ensuit l'endocytose par les hépatocytes, qui peut également être médiée par le LDL-R, le LRP et SR-B1 (Ji et al. 1997; Mahley 1999).

II. Les enzymes lipolytiques

La superfamille des lipases inclut la lipoprotéine lipase (LPL), la lipase hépatique (HL), la lipase pancréatique et la lipase endothéliale (Wong 2002). Ces différentes protéines sont codées par des gènes présentant d'importantes similarités. Elles exercent toutes une fonction enzymatique d'hydrolyse des TG mais diffèrent par leur site de synthèse et leur spécificité de substrat (Tableau 3).

1. La lipoprotéine lipase (LPL)

La LPL a été découverte en 1943 par Paul Hahn. Ce dernier a procédé à une injection d'héparine et observé que cela entrainait une diminution de la lipidémie habituellement associée à l'absorption d'un repas contenant des acides gras. Le facteur responsable de cette observation a été nommé « heparin-releasable clearing factor lipase » et par la suite lipoprotéine lipase.

La LPL est une enzyme clé du métabolisme des lipoprotéines, qui a pour rôle d'une part d'hydrolyser les TG des lipoprotéines riches en TG et d'autre part de faire un pontage entre les HSPG présents à la surface cellulaire et les lipoprotéines. Elle est sécrétée par différents types de cellules (cellules musculaires, adipocytes, macrophages) mais ne l'est pas par le foie (excepté durant la période néonatale). Une fois sécrétée, elle circule majoritairement associée aux VLDL, sa concentration dans le plasma humain étant seulement d'environ 92 ng/ml, et

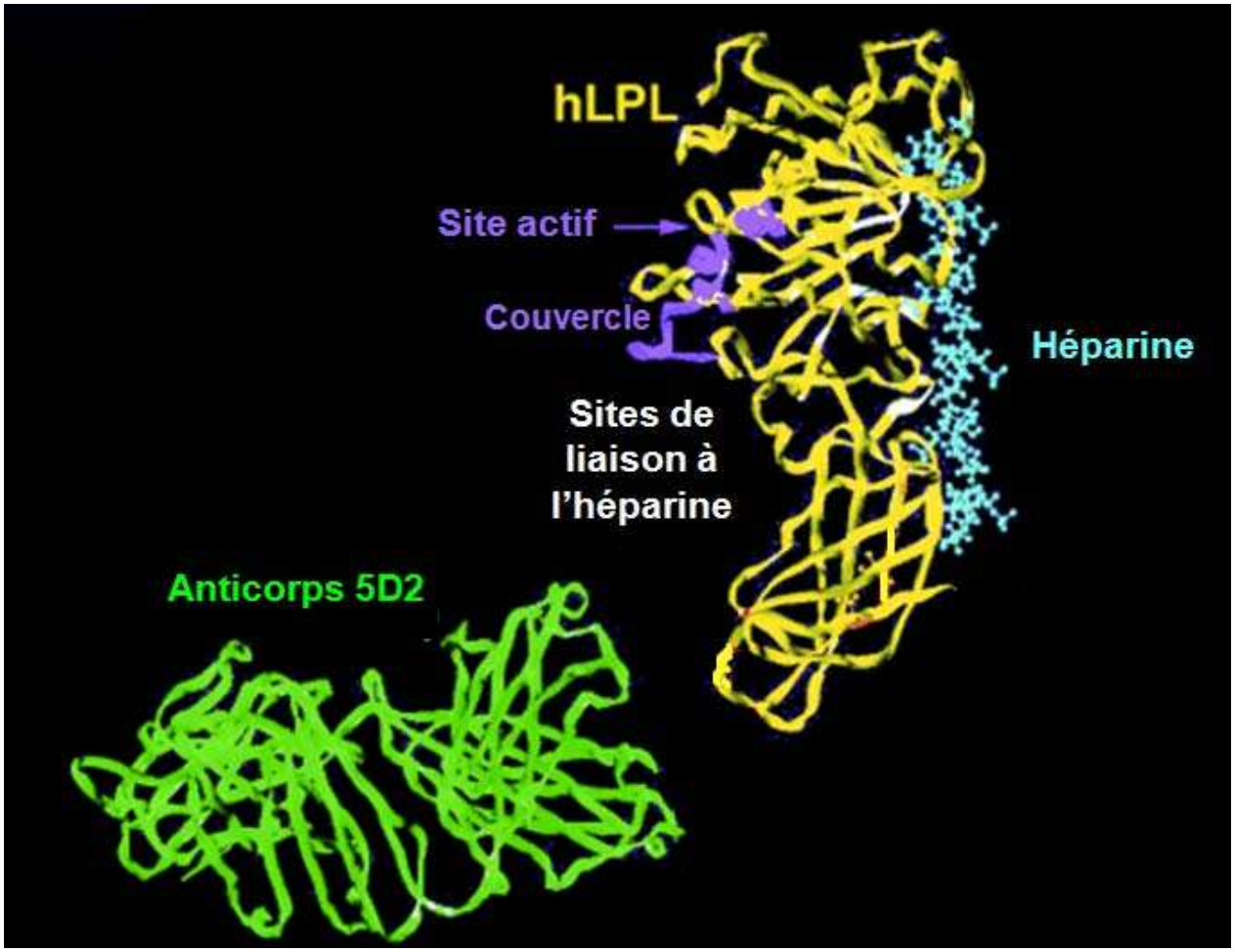


Figure 20 : Structure de la LPL. D'après Chang, *Journal of Lipid Research* (Chang et al. 1998)

Représentation schématique de la structure tridimensionnelle de la LPL humaine (hLPL), sous forme dimérique (en jaune), ainsi que de l'anticorps monoclonal anti-LPL 5D2 (en vert) dirigé contre le site actif de l'enzyme. Le site actif et le « couvercle » amovible sont représentés en mauve. Une molécule d'héparine est représentée (en bleu) proche des motifs connus de liaison à l'héparine (en blanc).

est rapidement transférée aux héparanes sulfates présents à la surface des cellules endothéliales de la paroi intraluminale de l'endothélium vasculaire, où elle se concentre (Mead et al. 2002; Merkel et al. 2002).

1.1. Structure

Le gène de la LPL, situé sur le chromosome 8, fait environ 35kb et est formé de 10 exons. Son promoteur humain (hLPL) est activé lorsqu'il y a hétérodimérisation des PPARs (Peroxisome Profiferator-Activated Receptors) avec le RXR (Retinoic Acid Receptor) (Mead et al. 2002; Merkel et al. 2002).

La LPL est une protéine de 448aa (55kDa) sous sa forme glycosylée. Elle possède un large domaine Nt contenant le site actif recouvert d'un « couvercle » amovible bloquant ou libérant l'accès du substrat, un site de liaison aux lipides, à l'héparine et au cofacteur ApoC2. Le domaine Ct contient également un site de liaison aux lipides, à ApoC2, à l'héparine et aux héparanes sulfates (Figure 20) (Mead et al. 2002; Merkel et al. 2002).

La LPL est catalytiquement active sous forme d'un dimère « tête-queue ». Les 2 sites actifs sont accessibles mais ne sont capables d'hydrolyser un substrat qu'alternativement : la conformation d'un monomère semble en effet empêcher l'autre d'être actif au sein du dimère. La forme inactive est prédominante dans le sang (environ 4 ng/ml de LPL active dans le sang seulement), la fraction active, dimérique, de la LPL étant majoritairement liée à l'endothélium au niveau des HSPG ou GPIHBP1 (petite glycoprotéine ancrée à la membrane par un glycosylphosphatidylinositol ou GPI) (Peterson et al. 1992; Beigneux et al. 2009).

1.2. Fonctions

- Fonction catalytique :

La LPL est une enzyme lipolytique exerçant une activité estérase et phospholipase A1 sur les TG et les phospholipides des lipoprotéines. Elle hydrolyse les TG des lipoprotéines contenant des ApoB riches en TG (TRL pour Triglyceride Rich ApoB-containing Lipoprotein) que sont les chylomicrons et les VLDL et libère ainsi des acides gras (FFA : Free Fatty Acid) et du glycérol, ce qui génère de l'énergie pour les tissus périphériques. Les FFA sont internalisés *via* divers récepteurs tels que CD-36 (Goldberg et al. 2009). Elle cible également les lipoprotéines vers le foie et transforme celles-ci au cours de leur catabolisme en diminuant leur charge lipidique et en favorisant les échanges de cholestérol et d'Apo entre les différentes

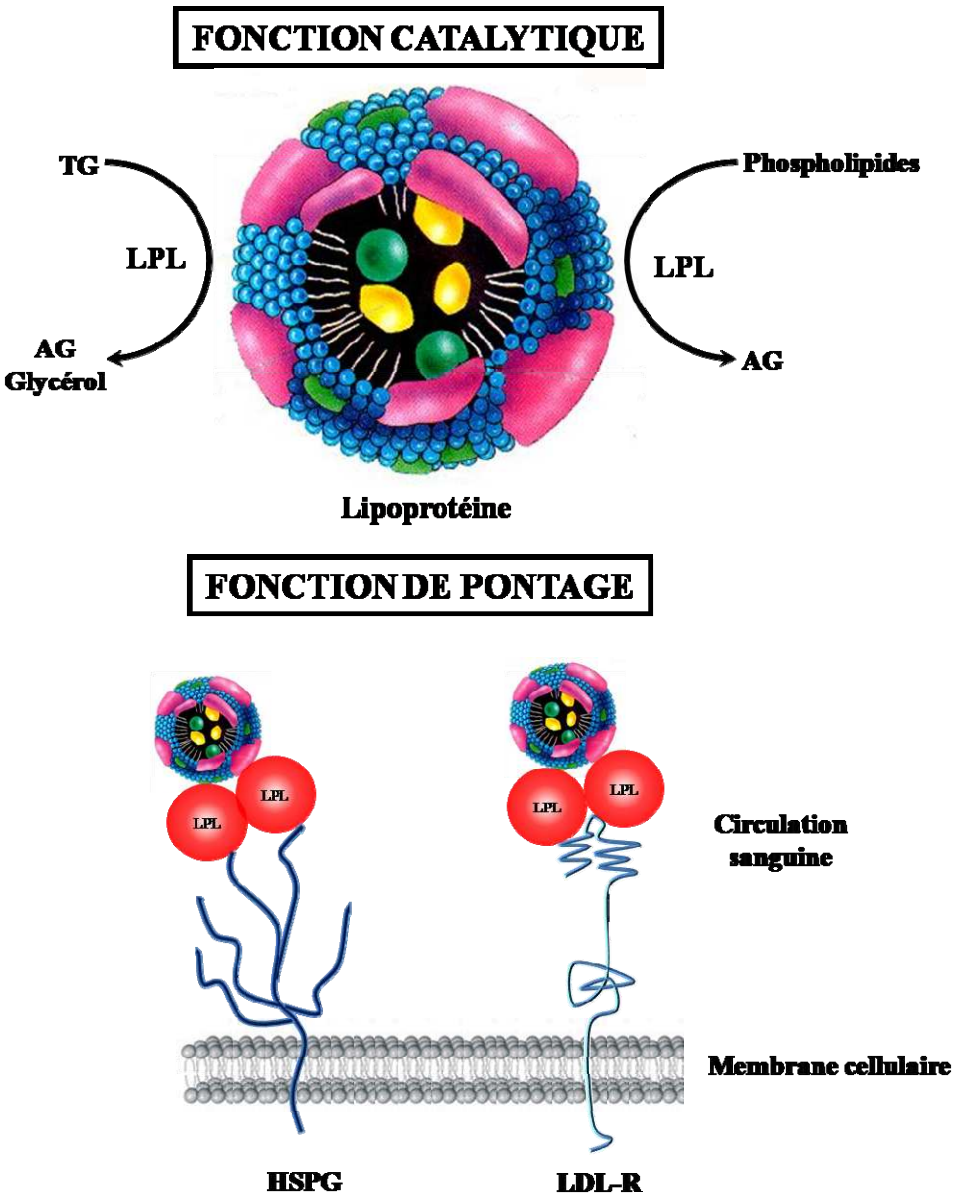


Figure 21 : Fonctions de la lipoprotéine lipase (LPL). D'après Rumsey, *Journal of Clinical Investigation* (Rumsey et al. 1992)

classes de lipoprotéines. L'activité de la LPL participe aussi à la formation des HDL qui incorporent le cholestérol et certaines Apo ainsi libérées. Son activité enzymatique nécessite l'ApoC2 comme activateur alors que l'ApoC3 et l'ApoC1 exercent un rôle inhibiteur (Mead et al. 2002; Zheng et al. 2006; Chan et al. 2008). Les remnants résultant du catabolisme des chylomicrons et des VLDL sont rapidement captés par le foie, *via* le LDL-R ou le LRP et les HSPG, capture médiée par ApoE qui est un ligand du LDL-R, et inhibée par ApoC1 (Jong et al. 1999; Mahley 1999; Hu et al. 2008).

- Fonction de pontage :

La LPL permet également, par une fonction dite de « pontage », grâce à son affinité pour les héparanes sulfates, de faire le lien entre ces derniers fixés à la cellule et les lipoprotéines (Figure 21) (Fernandez-Borja et al. 1996; Merkel et al. 1998). Cette propriété, indépendante de son activité catalytique, néanmoins dépendante de sa forme dimérique, favorise la liaison et/ou l'internalisation des lipoprotéines liées à la LPL et leur transfert vers leurs récepteurs que sont le LDL-R ou la LRP au sein des hépatocytes. Lors de l'endocytose de la LPL, il a été démontré qu'à la fois les HSPG et le LRP peuvent participer à sa capture et sa dégradation. En effet, la LPL agit comme ligand de LRP. RAP est un inhibiteur des liaisons au LRP : il abolit quasi totalement la capture de la LPL par les hépatocytes chez le rat. La liaison des LDL et VLDL à la surface cellulaire est augmentée en présence de LPL, ce qui aboutit à leur internalisation et leur dégradation (Rumsey et al. 1992; Verges et al. 2004; Page et al. 2006).

- HSPG :

Les HSPG sont abondants dans la matrice extracellulaire, particulièrement dans l'espace de Disse dans le foie, ainsi qu'à la surface des cellules de l'endothélium vasculaire. La clearance initiale des lipoprotéines commence avec la séquestration des lipoprotéines dans l'espace de Disse où la LPL joue un rôle de ligand et permet la capture de remnants. L'internalisation des lipoprotéines par le biais des HSPG est lente comparée à celle ayant lieu *via* les LDL-R (Mahley 1999; Hu et al. 2008).

- Héparine :

Il est intéressant de noter le rôle de l'héparine. En effet, sa présence permet, de par son action sur les HSPG, de libérer la LPL présente à la surface des cellules endothéliales, dans le foie et les tissus périphériques. Cette dernière peut être captée par le foie et dégradée ou aller se refixer à l'endothélium sinusoïdal hépatique. L'héparine, en libérant la LPL présente dans les

tissus extrahépatiques et à la surface de l'endothélium, et en stabilisant les dimères de LPL, entraine une plus grande activité de la LPL et par conséquent une augmentation de la lipolyse. Elle augmente également la capture de la LPL par le foie et diminue son taux dans les tissus périphériques (Peterson et al. 1992; Neuger et al. 2004; Kobayashi et al. 2007).

2. La lipase hépatique (HL)

La HL est principalement trouvée dans le foie chez la plupart des espèces animales et est reliée à la LPL de par sa structure et sa fonction. Elle appartient à la superfamille de gène des lipases (Santamarina-Fojo et al. 2004) et présente un rôle majeur dans le métabolisme des lipides.

2.1. Structure

La HL humaine est une glycoprotéine de 476aa (64kDa) synthétisée et sécrétée majoritairement par le foie. Elle est ancrée par les HSPG à la surface luminale des cellules endothéliales sinusoïdales du foie, sur la surface externe des microvillosités des hépatocytes localisés dans l'espace de Disse et dans l'espace interhépatocytaire (Verhoeven et al. 1999).
La HL présente 4 sites putatifs de N-glycosylation et cette N-glycosylation est requise pour que la HL soit synthétisée et active catalytiquement. Cela a été étudié *in vitro* dans des cellules d'hépatome HepG2 et *in vivo* dans des hépatocytes (Verhoeven et al. 1999).

2.2. Fonctions

- Fonction catalytique :
C'est une enzyme lipolytique, agissant comme ligand à la surface cellulaire pour capturer des lipoprotéines. La fonction catalytique de la HL implique l'hydrolyse des ponts acyl ester des phospholipides et des mono, di et TG trouvés dans toutes les classes de lipoprotéines, notamment dans les HDL et IDL. La HL est donc probablement impliquée dans le remodelage des HDL ayant lieu lors du transport reverse du cholestérol dans le foie et dans l'hydrolyse des IDL pour former les LDL qui pourront par la suite être internalisés (Ji et al. 1997; Verhoeven et al. 1999). L'activité lipolytique de la HL est inhibée quand elle est liée aux HSPG.

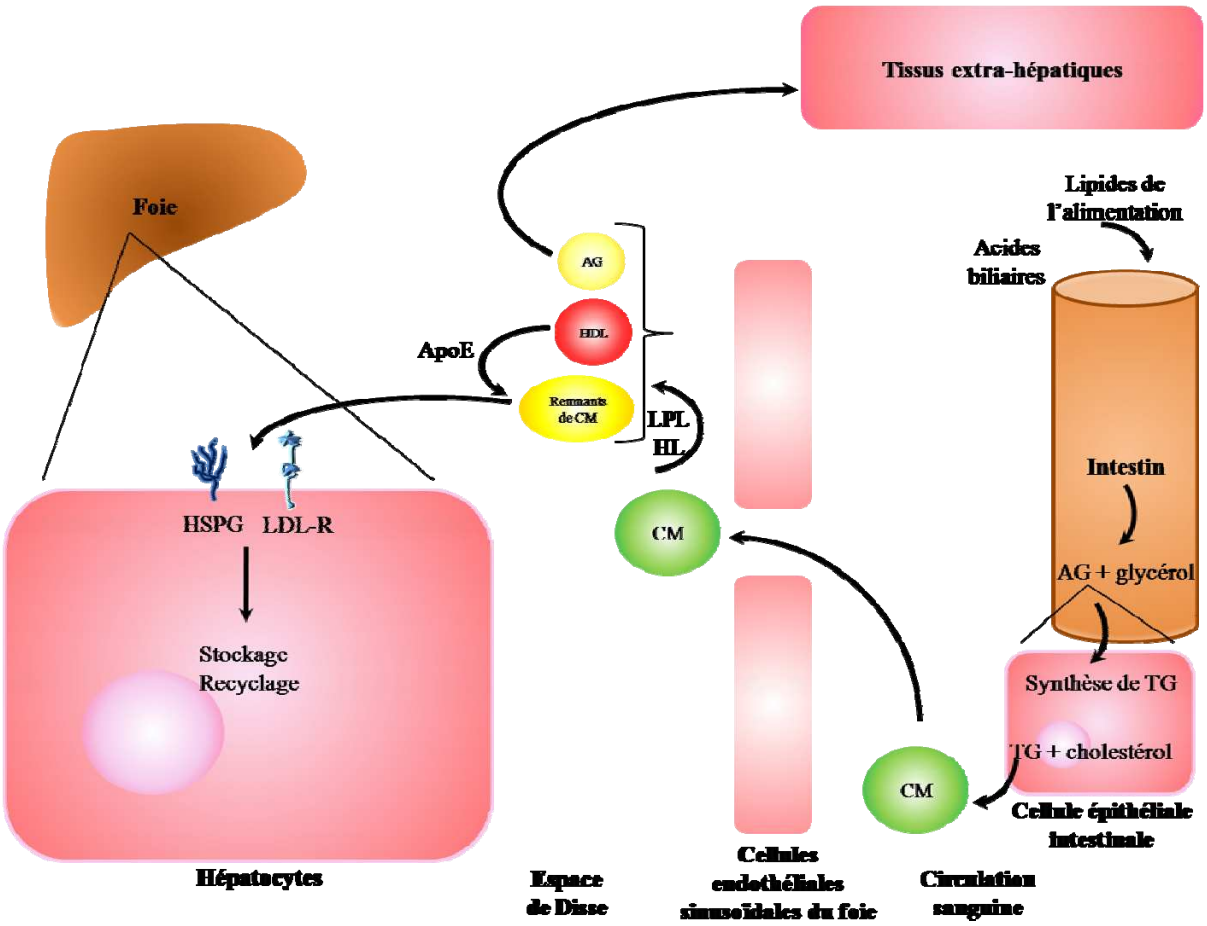


Figure 22 : Voie des lipides exogènes. D'après Lopez-Miranda, *British Journal of Nutrition* et Alonzi, *Expert Review of Proteomics* (Lopez-Miranda et al. 2007; Alonzi et al. 2008)

- Fonction de pontage :

Par sa fonction de ligand, la HL interagit avec les HSPG à la surface cellulaire et des récepteurs spécifiques incluant LDL-R et LRP, selon un processus indépendant de la lipolyse, et le complexe HL-lipoprotéine peut être internalisé, dans le but d'augmenter la clearance des lipoprotéines. Elle facilite donc la capture hépatique des remnants et du cholestérol portés dans les HDL et contribue ainsi activement au transport reverse du cholestérol.

- Régulation :

L'ApoA1 a la capacité de déplacer la HL des HSPG, entrainant ainsi son activation et la transformation des VLDL en LDL. De nombreuses études ont démontré une forte augmentation de l'hydrolyse de TG quand la HL est libérée des HSPG de la surface cellulaire après administration d'héparine. HDL et ApoA1 jouent un rôle important dans la régulation de la fonction et l'action lypolitique de la HL (Ramsamy et al. 2000; Ramsamy et al. 2003).

III. Transport des lipoprotéines

Il existe 3 principales voies de synthèse et transport des lipides dans le corps humain (voir revues générales (Alonzi et al. 2008; Williams 2008).

1. Voie des lipides exogènes

Cette voie correspond au transport des lipides de l'alimentation de l'intestin, où ils sont émulsifiés par action de la bile, vers le foie et les organes extra hépatiques. Des acides gras et du glycérol sont générés. Les acides gras sont dirigés vers les cellules épithéliales intestinales où a lieu la synthèse de TG. Des chylomicrons y sont alors formés par l'assemblage des TG et du cholestérol. Ceux-ci sont ensuite libérés dans la circulation et rapidement hydrolysés par la LPL pour donner les « remnants » de chylomicrons, par perte des acides gras. La perte des ApoA1 et A4 à la surface des « remnants » de chylomicrons sert à former, avec les phospholipides et l'ApoC, des HDL. Les « remnants » de chylomicrons récupèrent l'ApoE des HDL, favorisant ainsi leur pénétration dans les hépatocytes. Les lipides provenant de l'alimentation sont alors stockés et recyclés par le foie (Figure 22) (Alonzi et al. 2008; Chan et al. 2008).

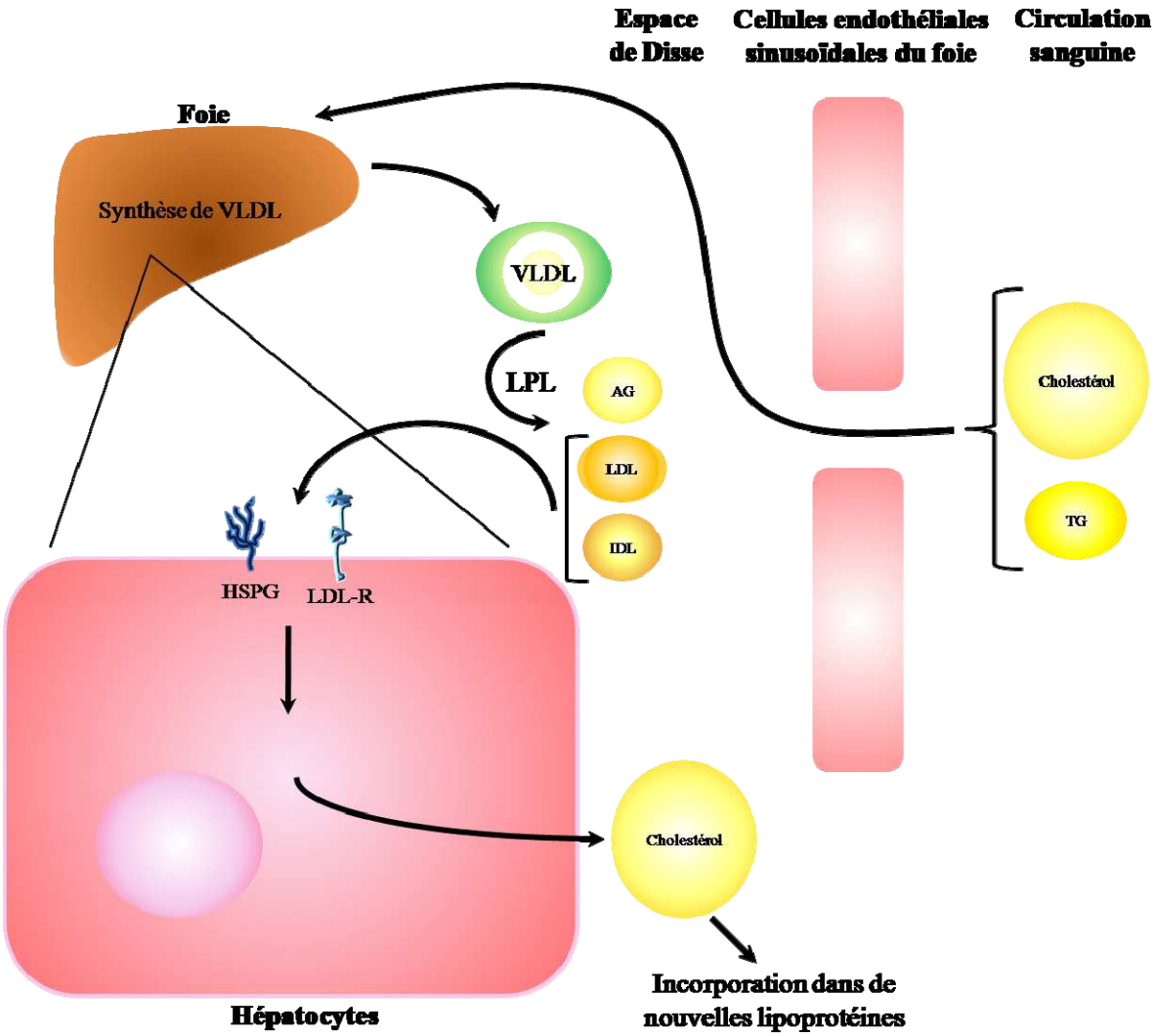


Figure 23 : Voie des lipides endogènes. D'après Lopez-Miranda, *British Journal of Nutrition* et Alonzi, *Expert Review of Proteomics* (Lopez-Miranda et al. 2007; Alonzi et al. 2008)

2. Voie des lipides endogènes

Les VLDL sont synthétisées par le foie à partir de TG et de cholestérol provenant de la circulation sanguine. La LPL hydrolyse par la suite ces VLDL pour former des « remnants » : des acides gras et à un stade ultérieur des IDL (Intermediar Density Lipoprotein) puis des LDL après perte des ApoC et E par l'action de la lipase hépatique (HL). L'ApoB100 est le constituant protéique essentiel des LDL et la liaison des LDL au LDL-R à la surface des hépatocytes et d'autres cellules en dépend directement. Les IDL et LDL sont donc captés de la circulation par les hépatocytes *via* le LDL-R, puis endocytés de façon clathrine-dépendante. S'ensuit la libération de cholestérol qui sera par la suite incorporé dans de nouvelles lipoprotéines (Figure 23) (Alonzi et al. 2008).

3. Voie du transport reverse du cholestérol

Les HDL permettent le retour du cholestérol en excès des tissus extra hépatiques vers le foie. Elles sont formées majoritairement à partir des constituants libérés lors du catabolisme des lipoprotéines de faible densité, mais aussi par l'association d'une ApoA1 avec du cholestérol libre et des phospholipides. Cette propriété des HDL leur confère un pouvoir hypocholestérolémiant. Les HDL fournissent le cholestérol au foie de façon directe au moyen du récepteur SR-B1. De façon indirecte, la protéine CETP (Cholesterol Ester Transfer Protein), ainsi que la HL, transfèrent le cholestérol des HDL aux LDL et VLDL et après endocytose de ces lipoprotéines, celui-ci est ensuite catabolisé dans les hépatocytes, d'où il sera excrété par la bile (Figure 24) (Lewis 2005; Alonzi et al. 2008).

IV. Interaction VHC - lipoprotéines

Les liens établis entre le VHC et les lipoprotéines sont nombreux. En effet, le VHC présent dans le sérum de patient infecté présente un profil de densité extrêmement hétérogène (1,03 à 1,34g/ml), du fait de son association avec des lipoprotéines. Nous pouvons aussi noter l'utilisation de 2 récepteurs aux lipoprotéines par le VHC : LDL-R et SR-B1 (Agnello et al. 1999; Molina et al. 2007). De plus, la protéine de capside est capable d'inhiber l'activité de la MTP (Perlemuter et al. 2002), entrainant ainsi l'inhibition de la formation de VLDL et par conséquent l'accumulation de lipides dans le foie ou stéatose (Roingeard 2008). Il a

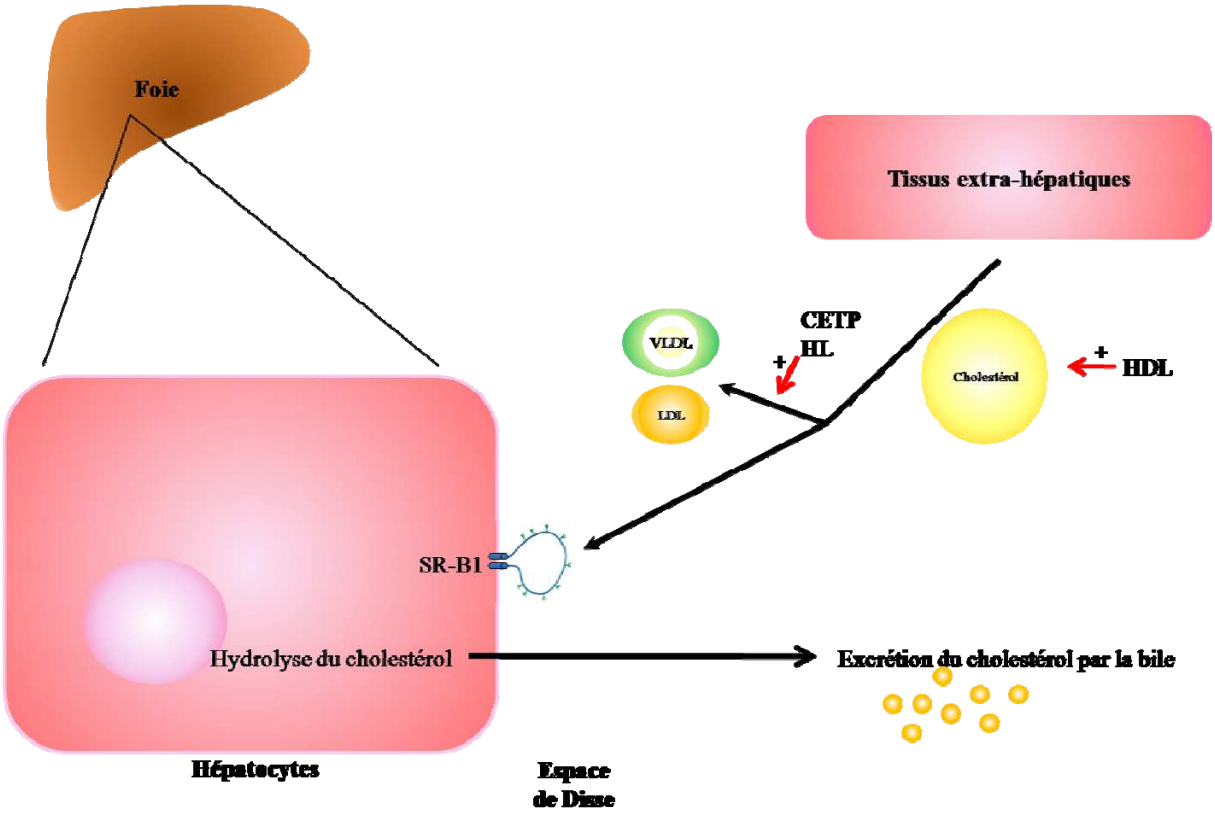


Figure 24 : Voie du transport reverse du cholestérol. D'après Lopez-Miranda, *British Journal of Nutrition* et Alonzi, *Expert Review of Proteomics* (Lopez-Miranda et al. 2007; Alonzi et al. 2008)

également été montré que la protéine de capside recrute protéines non-structurales et complexes de réplication au niveau des membranes des LD, ce qui est critique non seulement dans la réplication, mais aussi dans toute la morphogénèse du VHC et pour la production de particules virales infectieuses (Miyanari et al. 2007; Ogawa et al. 2009). Enfin, il est intéressant d'observer que plus la densité des particules virales est faible, plus celles-ci sont infectieuses, *in vitro* et *in vivo* (Agnello et al. 1999). Aizaki a notamment montré le rôle essentiel du cholestérol et des sphingolipides associés au VHC dans l'internalisation, la morphogénèse et l'infectiosité du virus (Aizaki et al. 2008). De plus, des anticorps anti-β lipoprotéines inhibent efficacement l'infection par HCVcc (Andreo et al. 2007). En outre, l'infectiosité du VHC est régulé par ApoC1, Apo prédominante dans les HDL (Meunier et al. 2005) et également actrice importante de la fusion membrane cellulaire-VHC (Dreux et al. 2007). Enfin, des siRNA dirigés contre l'ApoB (Huang et al. 2007) ou l'ApoE (Chang et al. 2007) inhibent efficacement la sécrétion de VHC. En 2009, il a aussi été montré que l'ApoE associée au VHC facilite l'infection par interaction avec le LDL-R (Owen et al. 2009). Puisque toutes ces Apo (B, E et C1) sont des composants majeurs des VLDL, ces différentes études soulignent le rôle des lipoprotéines et de leurs composants dans l'infectiosité du VHC (Kapadia 2005; Ye 2007).

Bien que le mécanisme soit inconnu, de nombreux arguments plaident en faveur d'une association du virus avec les lipoprotéines au cours de l'assemblage de celles-ci : l'étude des LVP a montré, qu'une fois délipidées, celles-ci présentent la capside en leur centre, que l'association ApoB-ARN viral résiste à l'action des détergents et enfin, les LVP proviennent du foie et de l'intestin, les deux seuls organes à synthétiser des lipoprotéines (Nielsen et al. 2006).

Un modèle de cosynthèse du virus avec les ApoB a été proposé (Andre et al. 2002 et 2005) : les lipides utilisés pour l'assemblage des ApoB sont présents dans les LD. La MTP, nécessaire à la sécrétion des ApoB, transfère les lipides provenant des LD aux membranes du RE. Les TG des membranes du RE sont transférés vers les ApoB naissantes. Les glycoprotéines E1 et E2 sont enchâssées dans la membrane du RE et la protéine de capside est localisée à la surface des LD. Les complexes de réplication étant liés à la membrane du RE, E1 et E2 pourraient favoriser la fusion des LD riches en TG avec les particules portant l'ApoB dans la lumière du RE. Ce rôle d'E1 et E2 pourrait être facilité par le rôle inhibiteur de la protéine de capside sur la MTP. Durant le processus de fusion, les protéines de capside liées aux LD pourraient s'assembler pour former la capside contenant l'ARN viral.

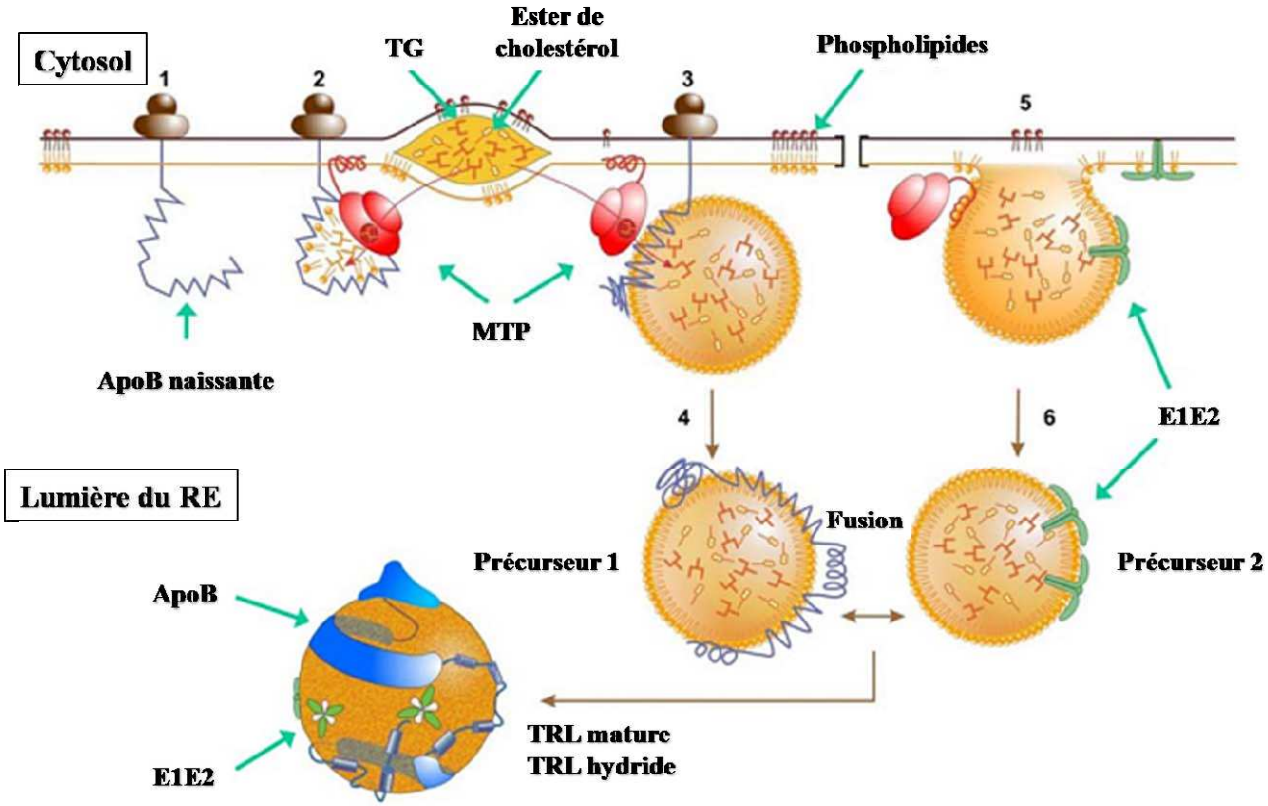


Figure 25 : Modèle de cosynthèse du VHC avec les ApoB. D'après Icard, *Plos One* (Icard et al. 2009)

1. L'ApoB naissante est transférée dans la lumière du RE durant sa traduction au niveau du RE rugueux.
2. Une petite cavité de lipides se forme à la membrane du RE, par l'action de la MTP qui permet le recrutement de TG et phospholipides.
3. Il se forme alors un cœur de lipides neutres et l'apparition d'une particule sphérique qui est libérée dans la lumière du RE après la fin de la traduction de l'ApoB.
4. Ceci correspond à la formation du précurseur 1 qui se meut dans la cellule vers un compartiment distal de la voie de sécrétion.
5. Dans le RE lisse, un 2ème précurseur se forme à partir de la membrane du RE et d'un enrichissement en TG médié par la MTP. A ce niveau, les glycoprotéines d'enveloppe sont retenues dans la membrane du RE après leur maturation et clivage par des peptidases du RE. L'hypothèse actuellement émise est que les dimères E1E2 diffusent de la membrane du RE au précurseur 2. Celui-ci se meut à son tour vers la voie de sécrétion.
6. Les 2 précurseurs fusionnent pour former une TRL mature, ou dans le cas de l'infection de la cellule par le VHC, une TRL hybride.

Dans ce modèle, E1 et E2 joueraient un rôle majeur dans le processus de fusion conduisant à la génération des LVP, dirigeant l'entrée de celles-ci dans la voie de sécrétion des lipoprotéines. Des données supplémentaires ont été apportées à ce modèle par Icard en 2009, suggérant que la synthèse du VHC pourrait faire appel à deux précurseurs, comme le montre la Figure 25 (Icard et al. 2009).

Enfin, il faut rappeler que notre équipe a mis en évidence le rôle des lipoprotéines dans l'interaction du VHC avec le récepteur SR-B1/Cla1. Cette association du virus avec les lipoprotéines permet l'entrée virale et a un effet protecteur sur le virus face à la présence d'anticorps neutralisants (Maillard et al. 2006). Le rôle essentiel des lipoprotéines dans l'entrée virale et l'infection de la cellule nous a amenés à analyser le rôle de la LPL dans l'entrée du VHC dans la cellule et son influence sur l'infectiosité du virus.

Outre cette particularité du VHC d'être associé aux lipoprotéines qui sont d'une importance capitale dans le cycle viral, notre intérêt pour la compréhension de l'entrée virale nous a conduits à nous intéresser au rôle des microtubules dans l'entrée du VHC dans la cellule et dans l'initiation d'une infection productive.

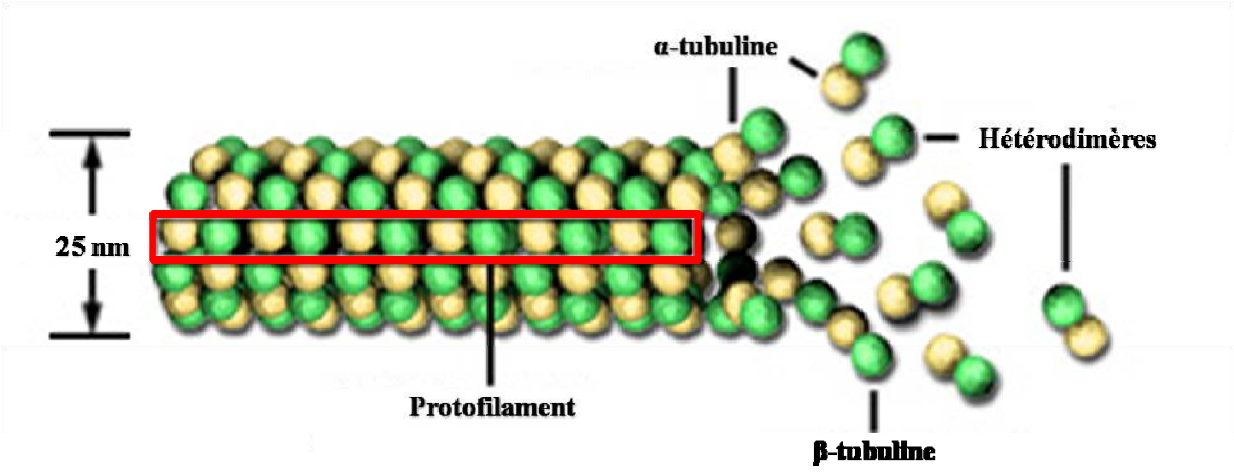


Figure 26 : Structure d'un microtubule (D'après le site internet Molecular Expressions™)

L'assemblage des hétérodimères de tubuline α et β constitue un protofilament (encadré en rouge). L'association de 13 protofilaments forme le microtubule.

Le VHC et le transport par les microtubules

Une partie de mes travaux de thèse a abouti à la mise en évidence de l'importance majeure des microtubules dans les mécanismes d'entrée et d'infection de la cellule par le VHC. Ce chapitre s'attache donc à décrire l'organisation et les diverses fonctions des microtubules.

I. Les microtubules

1. Structure

L'assemblage de dimères de tubuline α et β s'effectue de façon organisée pour former un protofilament. L'association de 13 protofilaments va former une structure cylindrique hautement dynamique et polarisée : le microtubule. La polarité structurale des microtubules est conférée par l'association en « tête-queue » des hétérodimères de tubuline (Figure 26).

Ces hétérodimères s'assemblent et se désassemblent en permanence, ce qui correspond à deux phénomènes précis : le phénomène d'instabilité dynamique des microtubules et le phénomène dit du « treadmilling », décrit par Wegner en 1976 (Wegner 1976; Rodionov 1997). Le premier correspond au gain et à la perte concomitante de sous-unités au niveau de la même extrémité du microtubule alors que le second implique l'addition de sous-unités à l'extrémité positive et la perte de sous-unités à l'extrémité négative (Figure 27).

On distingue l'extrémité positive du filament, plus favorable à l'assemblage des dimères de tubuline (polymérisation 3 fois plus rapide), et l'extrémité négative pour laquelle les dimères ont moins d'affinité (se dépolymérise si elle n'est pas stabilisée par d'autres protéines).

L'extrémité négative des microtubules provient en majorité du centrosome ou centre organisateur des microtubules (MTOC : microtubules-organizing center), localisé à proximité du noyau. Le MTOC contient une matrice de tubuline γ. L'extrémité positive est quant à elle orientée vers la périphérie cellulaire (Figure 28).

L'assemblage des microtubules nécessite de l'énergie, sous forme de guanosine triphosphate (GTP) : c'est le cycle GTPase de la tubuline.

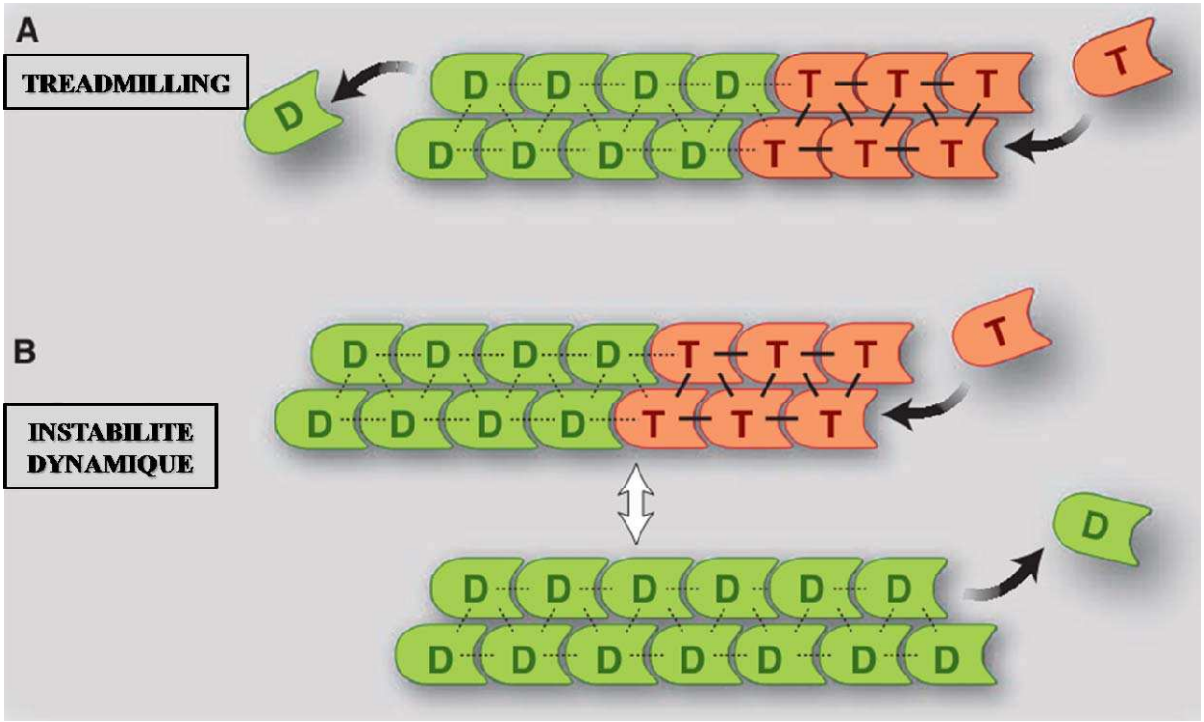


Figure 27 : Modèles de polymérisation dynamique. D'après Kueh, *Science* (Kueh 2009)
Les hétérodimères s'assemblent et se désassemblent en permanence.
A. Le phénomène d'instabilité dynamique correspond au gain et à la perte concomitante de sous-unités au niveau de la même extrémité du microtubule.
B. Le phénomène de « treadmilling » implique l'addition de sous-unités à l'extrémité positive et la perte de sous-unités à l'extrémité négative.
T : sous-unité liée à NTP (orange) ; D : sous-unité liée à NDP (vert).

2. Protéines moteurs

Deux protéines associées aux microtubules assurent les déplacements des divers éléments, nommés « cargos », le long de ces derniers (Figures 29 et 30) : la dynéine et la kinésine. La vélocité est d'environ 2µm/s pour la kinésine et la dynéine pour de nombreux cargos.
Des petites GTPases de la famille Rab sont impliquées dans la régulation du recrutement de ces protéines motrices (Radtke et al. 2006).
Les mouvements bidirectionnels sont également d'une grande importance. Dans ce cas, les cargos changent constamment de direction : ils se meuvent le long des microtubules polarisés en utilisant des moteurs opposés. Les LD notamment se meuvent de façon bidirectionnelle (Welte 2004).

2.1. La kinésine

La kinésine se déplace sur les microtubules, vers leur extrémité positive. Elle fait partie d'une super famille protéique comprenant 14 familles. Les membres de la famille des kinésines partagent un domaine moteur conservé d'environ 40kDa, associé à d'autres domaines se liant aux cargos. La kinésine 1 est la plus abondante. Elle comporte 2 chaines lourdes (KHC, 120kDa) et 2 chaines légères (KLC, 64kDa). Cette protéine multi-domaine contient dans sa partie Nt 2 domaines moteurs catalytiques, responsables de la motilité et de la génération de la force motrice. Ceux ci sont connectés par une tige à une queue globulaire qui se lie directement ou indirectement au cargo. Les domaines moteurs lient les microtubules et entrainent un changement conformationnel, dirigé par hydrolyse de l'ATP, ce qui propulse la molécule de kinésine et le cargo qui y est attaché vers l'extrémité positive des microtubules. La partie Ct de KLC et la queue de KHC médient la liaison au cargo. La kinésine 1 peut interagir avec une autre molécule, la dynéine cytoplasmique, par le biais de KLC, au niveau de la chaine intermédiaire de la dynéine. Concernant la régulation, le transport peut être contrôlé au niveau des domaines moteurs, en altérant la façon dont ces derniers se lient à la tige, ou bien il peut y avoir régulation par la façon dont les cargos s'amarrent aux moteurs (Dohner et al. 2005; Henry et al. 2006).

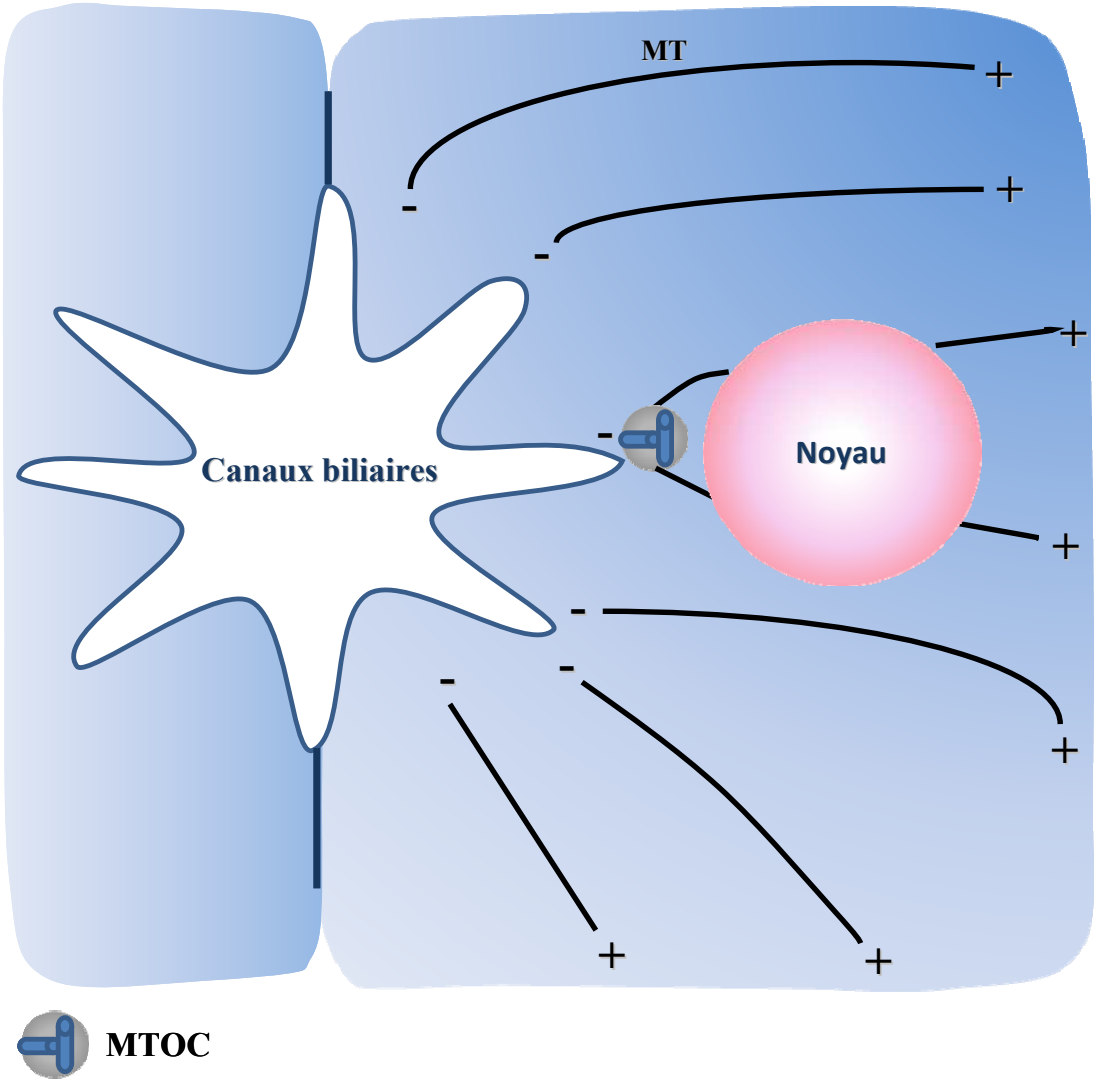


Figure 28 : Organisation des microtubules dans une cellule épithéliale hépatique polarisée. D'après Döhner, *TRENDS in Microbiology* (Dohner et al. 2005)
L'extrémité négative des microtubules pointe vers les canaux biliaires à la surface apicale de la cellule. L'extrémité positive pointe vers la membrane basale. Seule une petite partie des microtubules est associée au MTOC.

2.2. La dynéine

La dynéine se déplace vers l'extrémité négative des microtubules. La dynéine cytoplasmique de type 1 est le moteur prédominant pour le transport en direction de cette extrémité négative. C'est un grand complexe protéique multimérique, comportant 2 chaines lourdes (DHC, 520kDa), 2 chaines intermédiaires (DIC, 74kDa), plusieurs chaines intermédiaires légères (DLIC, 53-57kDa) et une série de chaines légères (DLC). La partie Ct de DHC comporte une tête globulaire hydrolysant l'ATP et une tige se terminant en domaine de liaison aux microtubules. La partie Nt permet la dimérisation de DHC et sa liaison à DLIC et DIC, qui se lie aussi à DLC. DIC, DLIC et DLC sont impliqués dans la liaison au cargo ainsi que dans la régulation de l'activité moteur. La dynéine s'associe aussi à un autre complexe protéique, la dynactine, qui augmente l'activité de la dynéine et est essentiel à l'attachement de la dynéine au cargo (Dohner et al. 2005; Henry et al. 2006).

3. Fonctions dans une cellule normale

Les microtubules sont des composants ubiquitaires majeurs du cytosquelette, jouant un rôle fondamental au sein de la cellule. Ils participent notamment à l'organisation cytoplasmique, la différenciation cellulaire, la division cellulaire de par leur rôle dans la migration des chromosomes, à la motilité cellulaire et permettent le transport de vésicules et protéines diverses dans le cytoplasme jusqu'à des régions cellulaires spécifiques.

Du fait de ces nombreux rôles, leur dynamique est hautement régulée par une machinerie de protéines complexe s'associant à leur extrémité et ayant une action soit stabilisatrice, soit déstabilisatrice des microtubules polymérisés. Ces protéines jouent également un rôle important dans l'ancrage et la nucléation des microtubules au niveau du centrosome, ainsi que dans leur interaction avec d'autres structures cellulaires (Dohner et al. 2005).

4. Fonctions dans une cellule infectée

Les cellules normales présentent des inclusions stockant des agrégats de protéines : les aggresomes. Ceux-ci immobilisent les agrégats de protéines et les rend ainsi susceptibles à une protéolyse par les protéasomes ou par autophagie. Ces aggresomes ont pour caractéristique d'être transportés par les microtubules. Des inclusions similaires sont observées dans les cellules infectées par des virus.

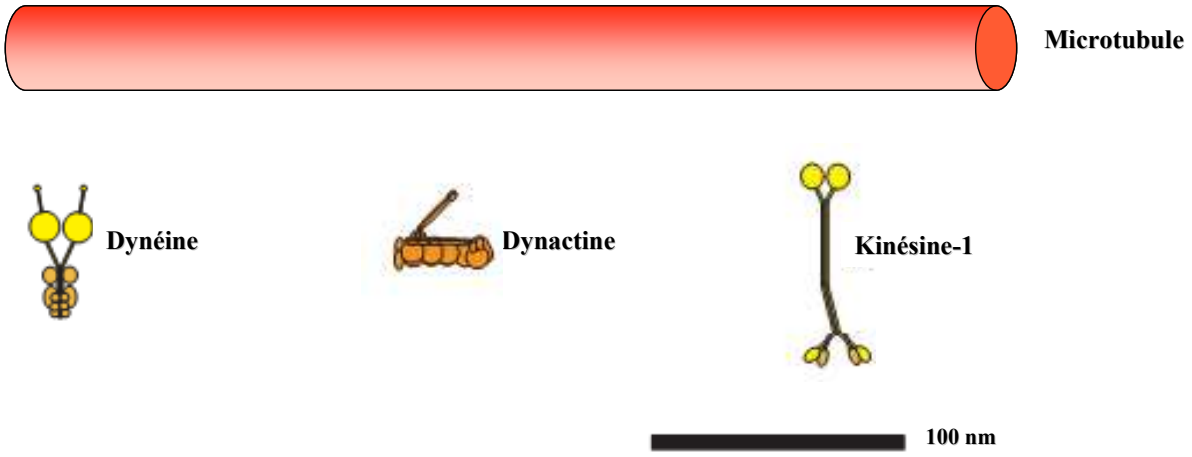


Figure 29 : Représentation schématique des protéines motrices et protéines associées. D'après Radtke, *Cellular Microbiology* (Radtke, Dohner et al. 2006)

Les microtubules forment des cylindres de 25 nm de diamètre. Deux protéines associées aux microtubules assurent les déplacements des cargos le long de ces derniers. La kinésine se déplace vers l'extrémité positive des microtubules et la dynéine vers l'extrémité négative. La dynéine s'associe aussi à un autre complexe protéique, la dynactine, qui augmente l'activité de la dynéine et est essentiel à l'attachement de la dynéine au cargo. La dynéine consiste en 2 chaines lourdes DHC (en jaune) avec une activité motrice, ainsi que 2 chaines intermédiaires DIC, 2 chaines intermédiaires légères DLIC et 6 chaines légères DLC (en orange). Son cofacteur, la dynactine (en orange fonçé) consiste en une courte tige formée principalement de Arp1 et d'un bras flexible $p150^{Glued}$. La kinésine 1 contient 2 domaines moteurs (en jaune), correspondant aux chaines lourdes KHC, et 2 chaines légères KLC (en orange) attachées aux KHC.

Cela montre notamment l'utilisation de la machinerie de transport cellulaire par ces derniers (Wileman 2007).
Des interactions fonctionnelles entre virus et microtubules ont été montrées pour la première fois par des études ultrastructurales, en microscopie électronique, puis l'apparition de techniques de vidéomicroscopie a permis l'observation, par marquage direct de la capside virale, de mouvements des virus sur les microtubules (Greber 2006).
Les virus ont une large variété de voie de trafic dans la cellule. Ils peuvent être trouvés attachés à la surface de la membrane plasmique, dans les endosomes précoces ou tardifs, dans les lysosomes, libres dans le cytosol, le long des microtubules, accumulés au MTOC, adhérant à l'enveloppe nucléaire, ou dans certains cas dans le noyau (Dohner et al. 2005). Ils peuvent utiliser le système de transport constitué par les microtubules pour différentes étapes du cycle, car la présence de nombreuses organelles et du cytosquelette restreint la diffusion libre des molécules plus grandes que 500kDa dans le cytoplasme, ce qui nécessite par conséquent un moyen de transport actif.
De nombreuses interactions ont ainsi été observées entre des protéines virales et les protéines associées aux microtubules, notamment la chaine légère de la dynéine et un grand nombre de virus utilisent donc les microtubules, et par conséquent ses moteurs que sont la dynéine et la kinésine : HSV1, CMV, HIV1, rage, adénovirus, parvovirus, SV40, influenza, VHB, vaccine, etc… (Leopold 2006).
De plus, il a été montré que les mouvements bidirectionnels sont courants pour les virus, confortant ainsi le rôle fondamental du réseau de microtubules dans le cycle viral.

II. Cytosquelette et VHC

Les LD ont longtemps été considérées comme de simples sites de stockage, utilisées comme source de lipides neutres pour le métabolisme, la synthèse de membrane et la synthèse de stéroïdes. Cependant, plus récemment il a été montré que ce sont des organelles dynamiques, impliquées dans de nombreuses voies cellulaires incluant un engagement avec les microtubules pour le transport actif. Des analyses protéomiques ont montré que de nombreuses protéines sont associées aux LD mais leur rôle reste peu connu (Boulant et al. 2008).
La formation des complexes de réplication est fortement liée à l'organisation dynamique du RE, aux filaments d'actine et au réseau de microtubules (Wolk et al. 2008). Leur transport se

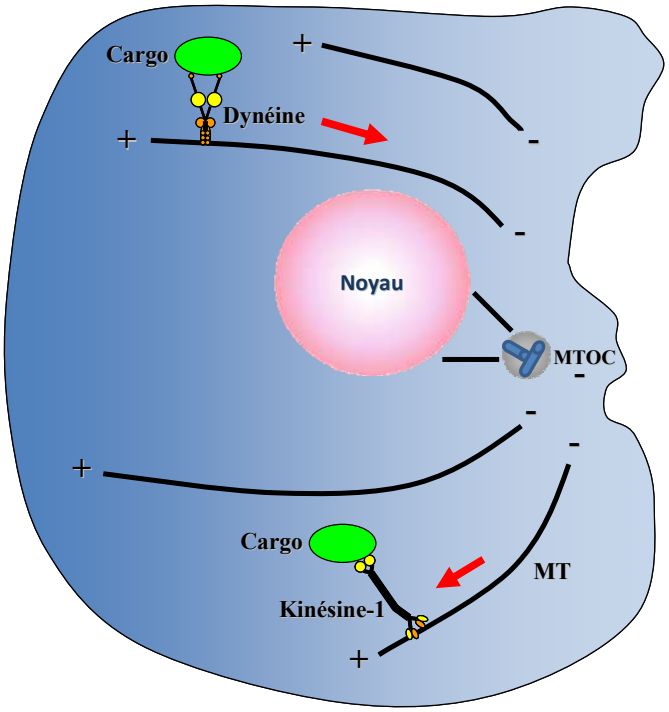


Figure 30 : Transport dans la cellule. D'après Henry, *Cellular Microbiology* (Henry et al. 2006)

La kinésine se déplace vers l'extrémité positive des microtubules et la dynéine vers l'extrémité négative, assurant le déplacement des cargos le long de ces derniers.

fait *via* le réseau de microtubules. Ces observations permettent de montrer un lien direct entre le réseau de microtubules et le cycle viral du VHC.

Du point de vue du cycle viral, après maturation par la signal peptide peptidase, la protéine de capside du VHC est envoyée vers les LD. La protéine de capside est une protéine composée de deux domaines D1 et D2, D2 étant responsable de l'association de la capside avec les LD.

Des études ont révélé que certaines étapes de la voie d'assemblage des particules virales ont lieu près de ces organelles. L'association des LD à la protéine de capside est donc liée à la production du virus dans les cellules infectées (Miyanari et al. 2007; Roingeard 2008).

La capside est impliquée dans la redistribution des LD autour du noyau dans les cellules infectées (Boulant et al. 2008). Cette redistribution a lieu le long du réseau de microtubules, de façon dynéine-dépendante. Ce mécanisme implique la dissociation de l'ADRP (Adipocyte Differentiation-Related Protein) des LD. Cette protéine, associée aux LD et exprimée de façon ubiquitaire, est nécessaire pour maintenir leur distribution intracellulaire. Dans les cellules infectées, la quantité d'ADRP diminue à la surface des LD pour être progressivement remplacée par la protéine de capside (Boulant et al. 2008). De plus, la destruction du réseau de microtubules diminue la libération de particules virales. Il existe donc un lien entre la dynamique des LD et le cycle viral du VHC (Ogawa et al. 2009).

Un modèle a été proposé : les sites contenant l'ARN viral répliqué sont souvent localisés proches des LD associées à la protéine de capside. Ces sites forment un lieu possiblement impliqué dans l'assemblage de virions, ou l'ARN répliqué est empaqueté dans la capside. Cela génèrerait ainsi des nucléocapsides qui vont acquérir une enveloppe lipidique contenant les glycoprotéines virales, entrainant la production de particules virales matures (Miyanari et al. 2007). En outre, le rôle essentiel des LD et des microtubules dans la production de particules virales infectieuses est lié à l'agrégation de complexe de réplication au niveau de ces LD (Figure 31) (Ogawa et al. 2009).

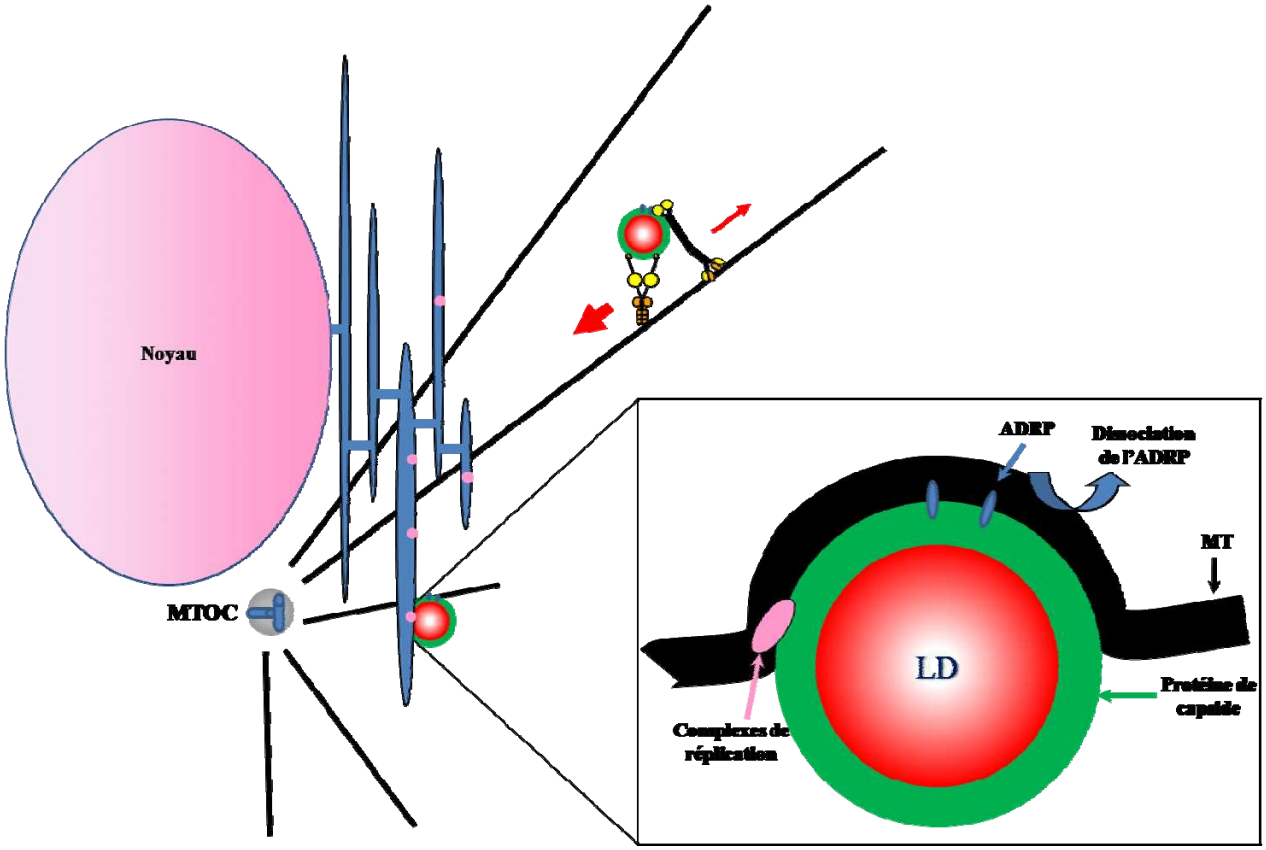


Figure 31 : Modèle décrivant le rôle putatif de l'association protéine de capside/LD dans le cycle viral du VHC. D'après Boulant, *Traffic* (Boulant et al. 2008)

En présence d'ADRP, les LD peuvent interagir avec les microtubules par l'intermédiaire des protéines moteurs (dynéine ou kinésine). Il en résulte une distribution uniforme des LD. Lorsque la protéine de capside se lie aux LD, l'ADRP se dissocie de la surface des LD. La perte de l'ADRP induit un déséquilibre entre les protéines motrices, ce qui conduit au déplacement des LD vers la périphérie nucléaire, près du MTOC. La redistribution des LD autour du MTOC résulte en une forte promiscuité de la protéine de capside avec le lieu de réplication de l'ARN viral, au niveau des invaginations de la membrane du RE ou « membranous web » (complexes de réplication). Cette promiscuité facilite le transfert de la protéine de capside au RE et son interaction avec l'ARN viral, pour former la nucléocapside.

OBJECTIFS DE THESE

Le mécanisme d'entrée du VHC dans les hépatocytes reste encore mal connu. Cependant, de nombreux arguments permettent de faire un lien entre le cycle du VHC et le métabolisme des lipoprotéines. En effet, la faible densité du VHC est due à une association du virus aux lipoprotéines (Thomssen et al. 1992; Prince et al. 1996; Agnello et al. 1999). En outre, parmi ses récepteurs putatifs, 2 sont des récepteurs aux lipoprotéines : LDL-R et SR-B1. Des résultats obtenus dans notre laboratoire, antérieurs à mon arrivée, ont démontré que le VHC naturel issu du sérum de patients infectés reconnaît SR-B1 *via* les lipoprotéines associées aux particules virales. Les lipoprotéines permettraient donc l'entrée virale et également la protection du virus face aux anticorps neutralisants (Maillard et al. 2006). La mise en évidence que l'association ApoE-VHC facilite l'infection par interaction avec le LDL-R a été cruciale (Agnello et al. 1999; Andre et al. 2005; Owen et al. 2009). De plus, il a également été montré que la protéine de capside recrute des complexes de réplication au niveau des membranes des LD, ce qui est critique pour la production de particules virales infectieuses (Miyanari et al. 2007).

Le fait que les lipoprotéines jouent un rôle crucial dans l'entrée virale et l'infection des cellules a permis d'émettre l'hypothèse que la LPL, enzyme clé du métabolisme des lipoprotéines, pourrait médier l'entrée du VHC dans la cellule et donc jouer un rôle dans l'infection. La LPL possède 2 fonctions : elle hydrolyse par sa fonction lipolytique les TG des TRL, et par une fonction de pontage, permet l'ancrage et l'endocytose de lipoprotéines, et sert comme ligand pour la famille des récepteurs de LDL. Notre groupe au sein de l'Unité Hépacivirus et Immunité Innée a donc proposé un nouveau mécanisme d'entrée du VHC dans la cellule par l'intermédiaire de la LPL, pouvant représenter une nouvelle voie d'entrée virale indépendante des autres récepteurs hépatiques du VHC ou une étape préliminaire d'entrée du virus associé aux lipoprotéines, précédant son interaction avec les récepteurs du virus.

Dans un premier temps, le rôle de la LPL dans l'attachement et l'internalisation du VHC naturel dans les hépatocytes a été étudié. Ces études ont permis de montrer que le mécanisme d'entrée virale médiée par la LPL est très similaire au mécanisme d'entrée dans les hépatocytes des lipoprotéines circulantes (Figure 32) (Andreo et al. 2007).

Lors de mon arrivée dans le laboratoire, une avancée majeure dans la recherche sur le VHC avait été réalisée : le groupe de Wakita venait de mettre en place le modèle de culture cellulaire HCVcc (JFH-1) permettant une infection productive avec sécrétion de particules

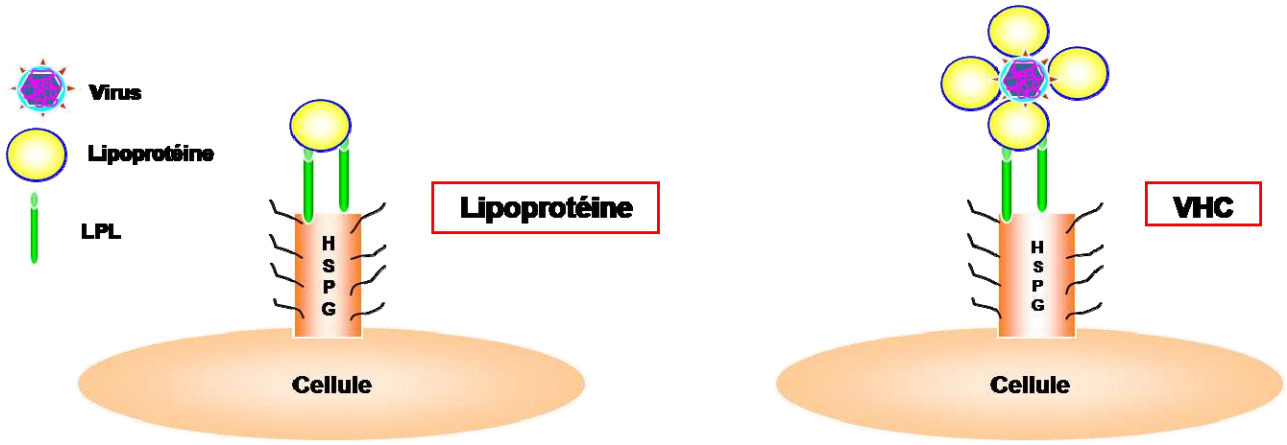


Figure 32 : Mécanisme d'entrée virale médiée par la LPL

infectieuses à partir de cellules infectées (Wakita et al. 2005; Zhong et al. 2005; Lindenbach et al. 2006). Dans ce contexte, nous avons établi comme objectifs pour mon projet de thèse :

1. d'analyser sur le modèle d'infection HCVcc l'effet de la LPL sur l'entrée virale,
2. d'étudier l'influence de la LPL sur l'infection de la cellule par le modèle HCVcc.

Les premiers résultats obtenus durant ma thèse ont cependant été totalement inattendus. Nos études n'ont corroboré que partiellement les résultats précédemment obtenus avec le modèle non réplicatif utilisant le virus sérique. Nous obtenons bien une augmentation de l'adsorption du HCVcc médié par la LPL, mais de façon surprenante, nous observons une inhibition de l'infection par le HCVcc en présence de LPL. Face à ces données ayant fait l'objet d'une publication à laquelle j'ai participé (Andreo et al. 2007), il nous a paru important d'examiner :

1. l'effet de la LPL sur l'infection de cellules avec différentes souches virales qui se répliquent de façon efficace *in vitro* : JFH-1 et J6/JFH-1, la nature des souches virales pouvant être importante en termes d'infectiosité,
2. l'effet de la LPL sur l'infection de cellules avec les mêmes souches virales produites *in vivo* chez des souris chimériques uPA-SCID transplantées avec des hépatocytes humains primaires, les propriétés des particules virales produites *in vitro* et *in vivo*, et l'effet de la LPL sur ces deux types de virus. Le virus produit chez les souris a probablement une composition en lipoprotéines associées plus conforme à celle du virus naturel, par rapport au virus produit en cellules Huh7.5.

Cette ouverture sur de nouveaux aspects inattendus de l'entrée virale a constitué une expérience extrêmement enrichissante pour mon travail de thèse.

Le laboratoire est également impliqué dans l'étude d'un lien entre le cytosquelette et l'infection par le VHC. Notre équipe analysant les mécanismes d'entrée du VHC dans la cellule, s'est intéressée au rôle des microtubules dans les phases précoces de l'infection et a montré l'existence d'une interaction entre la protéine de capside et la tubuline. Cela a posé les bases de ma participation à un deuxième article (Roohvand et al. 2009), faisant la seconde partie de ma thèse. Dans la continuité de ce travail, nous nous sommes posés la question du rôle du réseau de microtubules dans l'initiation de l'infection par le VHC, de l'attachement du virus à la surface de la cellule cible jusqu'à son transport intracellulaire après son internalisation, jusqu'à la fusion.

Les connaissances acquises par notre travail pourraient aboutir au développement de nouvelles approches antivirales.

RESULTATS

LISTE DES PUBLICATIONS

1. « Lipoprotein lipase mediates hepatitis C virus (HCV) cell entry and inhibits HCV infection » ; Ursula Andréo, Patrick Maillard, Olga Kalinina, **Marine Walic,** Eliane Meurs, Michèle Martinot, Patrick Marcellin et Agata Budkowska ; Cellular Microbiology (2007) 9(10), 2445–2456

2. « Lipoprotein lipase inhibits cell infection by Hepatitis C Virus produced in cell culture and in uPA-SCID mice engrafted with human primary hepatocytes » ; **Marine Walic***, Patrick Maillard*, Philip Meuleman, Farzin Roohvand, Thierry Huby, Takaji Wakita, Geert Leroux-Roels et Agata Budkowska ; Soumis

* Participated equally in this work

3. « Initiation of Hepatitis C Virus Infection Requires the Dynamic Microtubule Network - ROLE OF THE VIRAL NUCLEOCAPSID PROTEIN » ; Farzin Roohvand[1], Patrick Maillard[1], Jean-Pierre Lavergne, Steeve Boulant, **MarineWalic**, Ursula Andréo, Lucie Goueslain, François Helle, Adeline Mallet, John McLauchlan, et Agata Budkowska ; The Journal of Biological Chemistry Vol. 284, No. 20, pp. 13778–13791, May 15, 2009

[1]Participated equally in this work

PARTIE I : ROLE DE LA LIPOPROTEINE LIPASE ET DES LIPOPROTEINES ASSOCIEES AU VIRUS DANS L'ENTREE ET L'INFECTION DE LA CELLULE PAR LE VHC

ROLE DE LA LIPOPROTEINE LIPASE DANS L'ENTREE ET L'INFECTION DE LA CELLULE PAR LE VHC

Les interactions VHC-hôte conduisant à l'infection de la cellule par le VHC ne sont pas encore totalement élucidées. Les récepteurs putatifs du VHC à la surface de l'hépatocyte sont variés : CD81 (Pileri et al. 1998), SR-B1/Cla1 (Scarselli et al. 2002), LDL-R (Agnello et al. 1999; Andre et al. 2002), HSPG (Barth et al. 2003), et protéines de jonctions serrées Claudines (Evans et al. 2007; Zheng et al. 2007) et occludine (Ploss et al. 2009). De plus, le VHC interagit avec DC-SIGN (exprimé sur les cellules de Kuppfer, les cellules dendritiques et les lymphocytes) et L-SIGN (exprimé sur les cellules endothéliales sinusoïdales du foie). Les molécules non-spécifiques des hépatocytes peuvent avoir une fonction de récepteurs de capture, capables de concentrer et transmettre le virus aux cellules permissives et ainsi jouer un rôle dans l'infection (Cormier et al. 2004). Après attachement à différentes molécules de surface sur la cellule (HSPG, LDL-R, SR-B1/Cla1), le VHC interagit avec CD81, entrainant la formation d'un complexe CD81/SR-B1 qui est dirigé vers les jonctions serrées où il interagit avec Claudine et occludine (Evans et al. 2007; Ploss et al. 2009). Il a été démontré (modèles HCVpp et HCVcc) que l'internalisation des particules virales dans la cellule est clathrine-dépendante (Meertens et al. 2006; Blanchard et al. 2006). La fusion des glycoprotéines d'enveloppe virale avec la membrane endosomale se fait au sein des endosomes après acidification (pH optimal : 5,5) (Meertens et al. 2006; Perrault 2009). Le mécanisme d'entrée du VHC semble dépendre de la composition en lipides de la MP, de l'enveloppe virale et des lipoprotéines associées aux particules virales. Mais si ces récepteurs semblent jouer un rôle majeur dans l'entrée du VHC dans la cellule, la séquence d'événements conduisant à l'infection des hépatocytes humains reste encore mal connu. La majeure partie du VHC infectieux est associé à des lipoprotéines, principalement des LDL et des VLDL (Thomssen et al. 1992; Prince et al. 1996; Agnello et al. 1999; Andre et al. 2002 et 2005). Les lipoprotéines ont un rôle clé dans l'infection par le VHC : en effet, seules les fractions de faible densité contenues dans le sérum de patients infectés sont capables de transmettre l'infection aux chimpanzés (Bradley et al. 1991) et sont plus infectieuses *in vitro* (Agnello et al. 1999; Andre et al. 2002 et 2005; Lindenbach, Meuleman et al. 2006). De plus, l'infection chronique induit des changements dans le métabolisme lipidique du patient, tels qu'une diminution du taux de lipoprotéines sériques ou l'accumulation de lipides dans les

cellules du parenchyme hépatique (stéatose) (Roingeard 2008). Le fait que le cycle viral du VHC soit associé au métabolisme des lipoprotéines pourrait avoir des implications cruciales dans l'entrée virale, la morphogénèse et de développement de la persistance virale.
Du point de vue de l'entrée virale, CD81 et SR-B1/Cla1 se lient à la glycoprotéine d'enveloppe E2 et médie l'entrée de pseudotypes viraux exprimant les glycoprotéines d'enveloppe E1E2 à leur surface. Néanmoins, notre équipe a mis en évidence le rôle des lipoprotéines dans l'interaction du VHC avec le récepteur SR-B1/Cla1. Cette association du virus avec les lipoprotéines permet l'entrée virale et pourrait jouer un rôle protecteur pour le virus face à la présence d'anticorps neutralisants (Maillard et al. 2006). De plus, d'autres récepteurs aux lipoprotéines comme le LDL-R (Agnello et al. 1999; Andre et al. 2002 et 2005; Molina et al. 2007) ainsi que des molécules non-spécifiques impliquées dans l'entrée des lipoprotéines dans la cellule, les HSPG, sont également impliqués dans l'entrée du VHC dans la cellule. Nous avons aussi montré que les anticorps anti-β lipoprotéines inhibent efficacement l'infection par HCVcc (Andreo et al. 2007). Aizaki a également mis en évidence le rôle essentiel du cholestérol et des sphingolipides associés au VHC dans l'internalisation du virus (Aizaki et al. 2008). En outre, l'infectiosité du VHC est régulé par ApoC1, Apo prédominante dans les HDL (Meunier et al. 2005) et également actrice importante de la fusion membrane cellulaire-VHC (Dreux et al. 2007). En 2009, il a aussi été montré que l'ApoE associée au VHC facilite l'entrée du virus par interaction avec le LDL-R (Owen et al. 2009). Puisque toutes ces Apo (B, E et C1) sont des composants majeurs des VLDL, ces différentes études soulignent le rôle des lipoprotéines et de leurs composants dans l'entrée du VHC (Ye 2007; Gastaminza et al. 2008).

La LPL appartient à la famille des triglycérides-lipases (Tableau 3). Elle est synthétisée par les cellules musculaires, les adipocytes et les macrophages et devient active à la surface de l'endothélium vasculaire. La LPL agit principalement comme une triacylglycérol hydrolase, hydrolysant les TG des lipoprotéines riches en ApoB comme les chylomicrons ou les VLDL. La LPL dimérique médie la clearance des TRL de la circulation par une fonction de pontage entre les lipoprotéines et les HSPG présents à la surface cellulaire. Elle cible les TRL dans le foie, où elles sont internalisées puis dégradées par les hépatocytes. Cette fonction ne requiert pas l'activité lipolytique de la LPL (cf Figure 21) (Mead et al. 2002; Merkel et al. 2002).

Les études menées dans l'Unité Hépacivirus et Immunité Innée ont montré que la LPL médie la liaison et l'internalisation du VHC naturel (Andreo et al. 2007). Le mécanisme d'entrée

cellulaire du virus associé aux lipoprotéines est similaire au mécanisme conduisant à la clearance hépatique des lipoprotéines de la circulation médiée par la LPL (cf Figure 32). En effet, nos études ont montré que la LPL, ajoutée comme ligand exogène à divers types de cellules dont des cellules CHO ou des cellules d'hépatome humain, permet l'entrée et l'internalisation du virus dans ces cellules. Ce processus dépend de la LPL car il est inhibé de façon spécifique par des anticorps anti-LPL. L'interaction de la LPL avec le VHC naturel est dépendante de la présence des lipoprotéines associées aux particules virales et peut être bloquée par des anticorps anti-β lipoprotéines. En accord avec l'équipe de Zheng qui a montré que les HSPG présents à la surface cellulaire jouent un rôle essentiel dans la stabilité et l'activité de pontage de la LPL (Zheng et al. 2006; Williams 2008), nos études ont montré que les HSPG sont requis dans l'interaction VHC-cellule médiée par la LPL. En effet, la LPL n'augmente pas l'attachement du virus aux cellules CHO déficientes en HSPG ou traitées par de l'héparinase, enzyme digérant les HSPG. Les HSPG ont été proposés comme récepteur « primaire » du VHC naturel (récepteur peu spécifique mais abondant à la surface des cellules). En effet, les pseudoparticules virales portant les glycoprotéines d'enveloppe E1E2 à leur surface interagissent avec les HSPG de la surface cellulaire, par la protéine E2, et les HSPG sont probablement impliqués dans l'interaction du HCVcc avec la cellule (Koutsoudakis et al. 2006; Morikawa et al. 2007). Nos données suggèrent que le VHC peut également se lier indirectement aux HSPG présents à la surface cellulaire, *via* la LPL et les lipoprotéines associées aux particules virales.

Nous avons également démontré que la LPL humaine endogène surexprimée par la lignée monocytaire THP1 différenciée en macrophages après induction par dexaméthasone, permettent l'association du VHC à la cellule, alors que la LPL provenant de Pseudomonas sp. n'a aucun effet, ni sur l'interaction du virus avec la cellule, ni sur l'infection. Le mécanisme d'action de la LPL sur le VHC est donc spécifique de l'enzyme humaine ou bovine, qui sont hautement homologues.

La LPL existe sous une forme dimérique enzymatiquement active et monomérique catalytiquement inactive et incapable de médier le pontage (Merkel et al. 1998). La forme monomérique est dominante dans le sang où la LPL circule majoritairement associée aux VLDL. *In vivo*, il semble y avoir un équilibre régulant la formation de dimères et monomères, équilibre probablement maintenu grâce au pouvoir stabilisateur des HSPG à la surface des cellules (Lookene et al. 2004). *In vitro*, la forme dimérique est instable, les modifications de température et de pH entrainant sa dissociation en monomères. Nous avons montré l'effet de

la température sur la structure de la LPL par des tests ELISA, spécialement conçus pour détecter la forme dimérique ou monomérique de la LPL, impliquant l'anticorps monoclonal anti-LPL 5D2. Notre étude a confirmé que la structure dimérique de la LPL donc est indispensable à sa fonction enzymatique et sa fonction de pontage entre les lipoprotéines et les HSPG présents à la surface cellulaire, fonction conduisant à la clearance hépatique des lipoprotéines (Merkel et al. 2002).

Dans nos études du virus sérique, nous avons également montré que la THL, inhibiteur spécifique de la LPL se liant de façon covalente au site actif de l'enzyme sans affecter sa structure dimérique (Lookene et al. 1994), inhibe l'interaction du virus naturel médié par la LPL avec les cellules CHO, les cellules d'hépatome et les macrophages dérivés de THP1. Ces résultats suggèrent que la structure dimérique et l'activité catalytique de la LPL sont toutes deux requises pour l'interaction LPL-dépendante entre le virus naturel d'origine sérique et la cellule.

Nous avons aussi montré que la majeure partie du VHC est internalisé dans les cellules Huh7 en présence de LPL, par l'utilisation de chloroquine, agent lysomotrope bloquant les voies d'endocytose. Ces études ont montré que la LPL est un médiateur d'entrée du VHC dans la cellule par des mécanismes qui impliquent la formation d'un pont entre les lipoprotéines associées aux particules virales et les HSPG à la surface de la cellule. Ce mécanisme, similaire à la fixation et l'internalisation des lipoprotéines dans les cellules hépatiques, conduit à l'internalisation du virus dans la cellule.

Dans le contexte du développement d'un système de culture du VHC *in vitro*, en 2005 (noté HCVcc ou JFH-1), nous nous sommes donc intéressés au rôle de la LPL et des lipoprotéines associées au virus dans l'infection de la cellule par le VHC. De façon étonnante, nos données montrent que la LPL induit une inhibition significative de l'infection par le HCVcc *in vitro*. La LPL affecte les stades précoces de l'infection, car lorsque celle-ci est ajoutée aux cellules 2h après infection, elle n'induit aucun effet inhibiteur. Nous avons considéré la possibilité que l'inhibition de l'infection par le HCVcc pouvait résulter de l'action lipolytique de la LPL, comme cela avait été précédemment décrit pour le VHC d'origine sérique avec la LPL de Pseudomonas sp. (Thomssen 2002). Cependant, nous n'avons pas observé d'effet significatif de la LPL sur l'infectiosité du HCVcc lorsque le virus est pré-incubé avec la LPL jusqu'à 4h à 37°C avant infection des cellules. L'ensemble de ces données suggère que la LPL médie l'entrée virale par un mécanisme similaire à celui de la clearance hépatique des TRL de la circulation, entrainant le virus dans une voie non productive.

Ces résultats constituent une ouverture dans l'étude des mécanismes de l'entrée du VHC et suggèrent ainsi que la LPL pourrait moduler l'infectiosité du VHC *in vivo*, entraînant le virus dans une voie abortive de l'infection. Ceci fait partie de nos études suivantes (Article 2).

Ces données ont fait l'objet de la première publication à laquelle j'ai participé **« Lipoprotein lipase mediates hepatitis C virus (HCV) cell entry and inhibits HCV infection »** publiée dans Cellular Microbiology en 2007 (Andreo et al. 2007).

ARTICLE 1

Cellular Microbiology (2007) 9(10), 2445–2456

Lipoprotein lipase mediates hepatitis C virus (HCV) cell entry and inhibits HCV infection

Ursula Andréo[1], Patrick Maillard[1], Olga Kalinina[1], **Marine Walic[1],** Eliane Meurs[1], Michèle Martinot[2], Patrick Marcellin[2] and Agata Budkowska[1]

1 Unité Hépacivirus Institut Pasteur, 25/28 Rue du Dr Roux, 75724 Paris Cedex 15, France.
2 INSERM, U-773, Centre de Recherche Biomédicale Bichat – Beaujon CRB3; Université Paris 7, Denis Diderot, site Hôpital Beaujon, 92110 Clichy, France.

Cellular Microbiology (2007) 9(10), 2445–2456

doi:10.1111/j.1462-5822.2007.00972.x
First published online 21 May 2007

Lipoprotein lipase mediates hepatitis C virus (HCV) cell entry and inhibits HCV infection

Ursula Andréo,[1] Patrick Maillard,[1] Olga Kalinina,[1] Marine Walic,[1] Eliane Meurs,[1] Michèle Martinot,[2] Patrick Marcellin[2] and Agata Budkowska[1]*

[1] *Unité Hépacivirus Institut Pasteur, 25/28 Rue du Dr Roux, 75724 Paris Cedex 15, France.*

[2] *INSERM, U-773, Centre de Recherche Biomédicale Bichat – Beaujon CRB3; Université Paris 7, Denis Diderot, site Hôpital Beaujon, 92110 Clichy, France.*

Summary

The host–virus interactions leading to cell infection with hepatitis C virus (HCV) are not fully understood. The tetraspanin CD-81 and human scavenger receptor SR-BI/CIa1 are major receptors mediating virus cell entry. However, HCV in patients' sera is associated with lipoproteins and infectious potential of the virus depends on lipoproteins associated to virus particles. We show here that lipoprotein lipase (LPL), targeting triglyceride-rich lipoproteins (TRL) to the liver, mediates binding and internalization of HCV to different types of cells, acting as a bridge between virus-associated lipoproteins and cell surface heparan sulfate proteoglycans (HSPG). The dimeric structure and catalytic activity of LPL are required for LPL-mediated HCV uptake to cells. Unexpectedly, exogenous LPL significantly inhibits HCVcc infection *in vitro*. This effect is prevented by anti-LPL antibodies and by tetrahydrolipstatin (THL) a specific inhibitor of LPL enzymatic activity. In addition, we show that antibodies directed to apolipoprotein B (ApoB)-containing lipoproteins efficiently inhibits HCVcc infection. Our findings suggest that LPL mediates HCV cell entry by a mechanism similar to hepatic clearance of TRL from the circulation, promoting a non-productive virus uptake. These data provide new insight into mechanisms of HCV cell entry and suggest that LPL could modulate HCV infectivity *in vivo*.

Introduction

Hepatitis C virus (HCV) is the principal cause of blood-transmitted chronic hepatitis, which may lead to liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. HCV is an enveloped virus of the Flaviviridae family, with a positive RNA genome encoding a single polyprotein processed by viral and cellular proteases into three structural (core, E1 and E2), P7 protein and several non-structural proteins in the cytoplasm of the infected hepatocyte (Penin *et al.*, 2004).

Various cell surface molecules are candidate receptors for HCV, including tetraspanin CD81, mannose-binding lectins DC-Sign, L-Sign, heparan sulfate proteoglycans, low-density lipoprotein receptor (LDL-R), human 'scavenger' receptor class B type I (SR-BI/CIa-1) (Pileri *et al.*, 1998; Agnello *et al.*, 1999; Germi *et al.*, 2002; Scarselli *et al.*, 2002; Lozach *et al.*, 2003; Cormier *et al.*, 2004) and Claudin-1 recently proposed as a co-receptor (Evans *et al.*, 2007). Among these CD-81 and SR-BI/CIa1 have been shown to play a major role in HCV cell entry (Lindenbach *et al.*, 2005; Wakita *et al.*, 2005; Zhong *et al.*, 2005; Kapadia *et al.*, 2007); however, the exact mechanism of HCV infection of human hepatocytes remains unclear. In addition, the structure of the natural infectious HCV particles is not well defined. Various viral forms have been isolated from patients' sera: lipo-viro particles (LVP) containing apolipoprotein B (ApoB) and apopolipoprotein E (ApoE) (André *et al.*, 2002), exosomes bearing HCV-RNA (Masciopinto *et al.*, 2004), flavivirus-like HCV virions unassociated with plasma lipoproteins (Petit *et al.*, 2005) and non-enveloped HCV nucleocapsids (Maillard *et al.*, 2001).

The majority of the infectious HCV circulates in the patient's serum in association with lipoproteins (mainly VLDL and LDL) (Thomssen *et al.*, 1992; Prince *et al.*, 1996). Lipoproteins play a key role in HCV infection: only low-density fractions of HCV-positive plasma samples transmitted infection to chimpanzees (Bradley *et al.*, 1991) and to cultured cells *in vitro* through the LDL receptor (LDL-R) (Agnello *et al.*, 1999; Monazahian *et al.*, 2000; André *et al.*, 2002). SR-BI/CIa1 binds HCV E2 envelope protein (Scarselli *et al.*, 2002) and mediates the uptake of viral pseudotypes expressing E1E2 envelope proteins on their surface (Bartosch *et al.*, 2003). Nevertheless, natural HCV interacts with SR-BI/CIa1 through virus-associated ApoB-containing lipoproteins (Maillard *et al.*, 2006).

A cell culture system, based on a cloned genotype 2a HCV isolated from a patient with fulminant hepatitis C, has been developed, making it possible to produce viral particles (HCVcc) that can infect hepatoma cells *in vitro* (Lindenbach *et al.*, 2005; Wakita *et al.*, 2005; Zhong *et al.*,

Received 26 January, 2007; revised 25 April, 2007; accepted 26 April, 2007. *For correspondence. E-mail abudkow@pasteur.fr; Tel. (+33) 14568 8261; Fax (+33) 14061 3841.

© 2007 The Authors
Journal compilation © 2007 Blackwell Publishing Ltd

2005). Secreted virus infects Huh-7.5 cells and transmits infection to chimpanzees and to mice with human liver grafts (Lindenbach *et al.*, 2006). Notably, the viruses recovered from these animals had a lower buoyant density and were much more infectious than the viruses initially produced in cell culture (Lindenbach *et al.*, 2006). These observations confirmed that lipoproteins and/or other host-specific factors play a crucial role in natural HCV infection.

Hepatitis C virus life cycle is associated with lipoprotein metabolism and lipoproteins may have important implications for viral cell entry, morphogenesis, tissue tropism and development of HCV persistence (André *et al.*, 2005). Lipoprotein lipase belongs to the triglyceride lipase family (Hide *et al.*, 1992). LPL is synthesized by smooth muscle cells and macrophages and becomes functional at the surface of vascular endothelium (Mead *et al.*, 2002). LPL acts mainly as a triacylglycerol hydrolase, hydrolysing triglycerides in triglyceride-rich ApoB-containing lipoproteins such as chylomicrons and very low-density lipoproteins (VLDL) (Mead *et al.*, 2002). Dimeric LPL mediates clearance of TRL from the circulation by acting as a bridge between lipoproteins and cell surface heparan sulfate proteoglycans (HSPG) (Williams *et al.*, 1992; Krapp *et al.*, 1995). LPL targets TRL to the liver, where they are internalized by hepatocytes for degradation (Heeren *et al.*, 2002).

In this study, we show that LPL mediates binding and cellular uptake of HCV in an HSPG-dependent manner. The mechanism for cellular uptake of lipoprotein-associated virus is similar to LPL-mediated hepatic clearance of lipoproteins from circulation. Our data show also that LPL has an inhibitory effect on HCV infection and suggest that LPL might modulate HCV infectivity *in vivo*.

Results

Exogenous, bovine LPL mediates binding of HCV to CHO cells

We used CHO cells to investigate whether bovine LPL, used as an exogenous ligand, could mediate binding of natural HCV to the cell surface. Bovine LPL is highly homologous to human LPL (Hide *et al.*, 1992) and CHO cells are commonly used to study the role of LPL in interactions between lipoproteins and cells (Berryman and Bensadoun, 1995). These cells do not express putative HCV receptors. The amount of HCV-RNA bound to cells increased in a dose-dependent manner in relation to the concentration of bovine LPL added (Fig. 1A).

We inhibited virus attachment to cells with an anti-LPL monoclonal antibody (mAb) 5D2 which binds to the C-terminal domain of LPL, involved in the interaction of LPL with lipoproteins and heparin (Liu *et al.*, 1992; Chang *et al.*, 1998) (Fig. 1B). Thus, LPL, known to mediate the uptake of triglyceride-rich lipoproteins to cells, also mediates the cellular binding and probably uptake of serum-derived HCV.

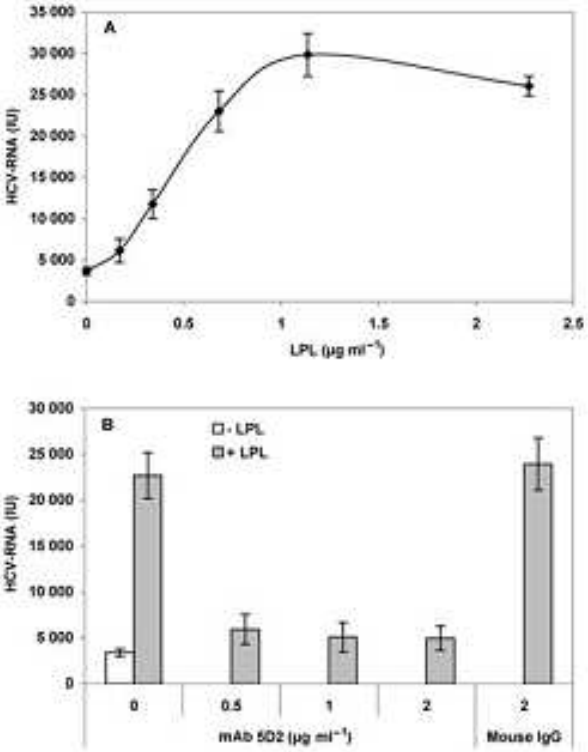


Fig. 1. Exogenous bovine LPL enhances HCV interaction with CHO cells.
A. The incubation of CHO cells with increasing concentrations of bovine LPL enhances HCV interaction with cells in a dose-dependent manner.
B. LPL-mediated HCV cellular uptake is inhibited by anti-LPL mAb 5D2. LPL was incubated with various concentrations (0.5–2 µg ml^{-1}) of mAb 5D2 before addition to CHO cells. Control samples incubated in the absence of mAb (0) or in the presence of 2 µg ml^{-1} normal mouse IgG are shown.

LPL mediates binding and internalization of lipoprotein-associated HCV into hepatoma cells

Virus interaction with Huh7 cells was also increased by 2- to 20-fold by bovine LPL for various serum samples from asymptomatic and symptomatic chronic HCV carriers independently of viral load. This enhancing effect was comparable to the effect of LPL on cellular uptake of lipoproteins (Casaroli-Marano *et al.*, 1998; Seo *et al.*, 2000; Heeren *et al.*, 2002; Mead *et al.*, 2002; Merkel *et al.*, 2002). The enhancing effect was specific for bovine LPL, which is highly homologous to human LPL, as LPL from *Pseudomonas* sp. had no effect on virus association with Huh7 cells (Fig. 2A). Statistical analysis described in *Experimental procedures* and carried out on three defined groups of

© 2007 The Authors

samples confirmed that these results were statistically significant: median (range) of HCV associated with cells were 180 200 (100 000–315 000), 1 400 000 (891 600–2 110 000) and 114 500 (70 900–198 700) expressed in international units (IU) for group 1 (Huh7 cells inoculated in the absence of LPL) ($n = 12$), group 2 (Huh7 cells inoculated in the presence of bovine LPL) ($n = 10$) and group 3 (Huh7 cells inoculated in the presence of LPL from *Pseudomonas* sp.) ($n = 9$) respectively ($P < 0.0001$). Two-by-two comparisons gave P-values of 0.0001 for group 1 versus 2, 0.0002 for 2 versus 3 and 0.02 for 1 versus 3.

Notably virus/cell interaction mediated by LPL was inhibited by antibodies directed to β-lipoproteins (Fig. 2B). This clearly demonstrated that lipoproteins associated to HCV play a key role in virus/cell interactions through LPL.

We investigated whether cell surface binding mediated by LPL leads to internalization of natural HCV into Huh7 cells. LPL increased virus interaction with hepatoma cells at 4°C (Fig. 2C) that implies increased virus binding to the cell surface. Following further incubation of the virus with cells at 37°C the amount of HCV-RNA associated with cells further increased. This observation suggests virus internalization into the cell via LPL by energy-dependent mechanisms.

LPL-mediated HCV/cell interaction depends on the presence of HSPG on the cell surface

LPL anchors lipoproteins to the cell surface, forming a bridge between cell surface HSPG and lipoproteins due to its heparin- and lipoprotein-binding domains. We investigated whether HSPG was involved in the LPL-mediated HCV interaction with cells. To this purpose, we compared the amounts of HCV associated with CHO cells expressing HSPG and with HSPG-deficient CHO-pgsA-745 cells, in the presence and absence of LPL. We showed by immunofluorescence microscopy that exogenous LPL bound to the wild-type CHO cells but not to HSPG-deficient cells (Fig. 3A and B). LPL enhanced HCV binding to wild-type CHO cells, but not to HSPG-deficient CHO cells (Fig. 3C). Equally, the effect of LPL on HCV binding to CHO cells was significantly weaker than in controls if the cells were treated with heparinase I, which cleaves cell surface HSPG (Fig. 3D). Thus, HSPG plays a critical role in LPL-mediated binding of HCV to the cell surface.

Endogenous LPL produced by human macrophages mediates HCV uptake.

We used THP1 cells to investigate whether human LPL, produced by THP1-derived macrophages, could also

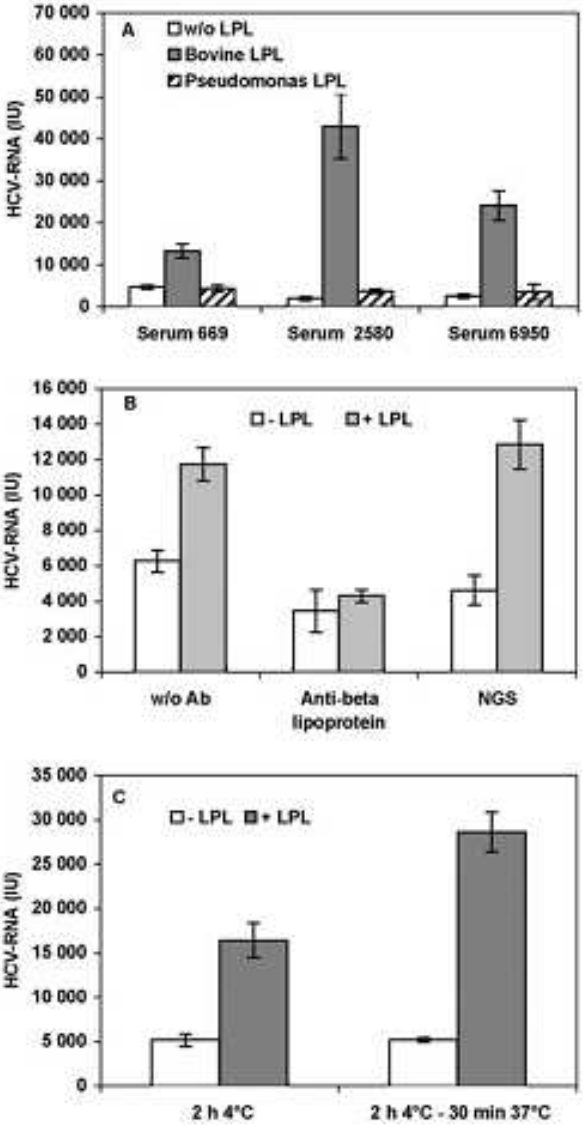


Fig. 2. Exogenous LPL mediates binding and internalization of natural HCV into Huh7 cells.
A. Higher amounts of virus are bound to Huh7 cells incubated with HCV-positive serum samples in the presence than in the absence of bovine LPL. LPL from *Pseudomonas* sp. has no enhancing effect on virus interaction with hepatoma cells. Results obtained for three serum samples are shown.
B. HCV cellular uptake in the presence of LPL is mediated by lipoproteins and thus inhibited by anti-β-lipoprotein antibodies. HCV-positive serum was incubated with anti-β-lipoprotein antiserum diluted (1:100) prior to incubation with Huh7 cells in the presence or in the absence of LPL. Normal goat serum (NGS) at the same dilution was used as a control.
C. LPL-dependent HCV internalization into Huh7 cells. Cells were pre-incubated with LPL for 30 min at 4°C and then with virus-containing samples for 2 h at 4°C to determine virus binding to the cell surface. Subsequently virus incubated with cells for 2 h at 4°C was incubated further for 30 min at 37°C. Increased amount of the virus associated with cells at 37°C as compared with 4°C suggests HCV internalization by energy dependent mechanisms.

© 2007 The Authors

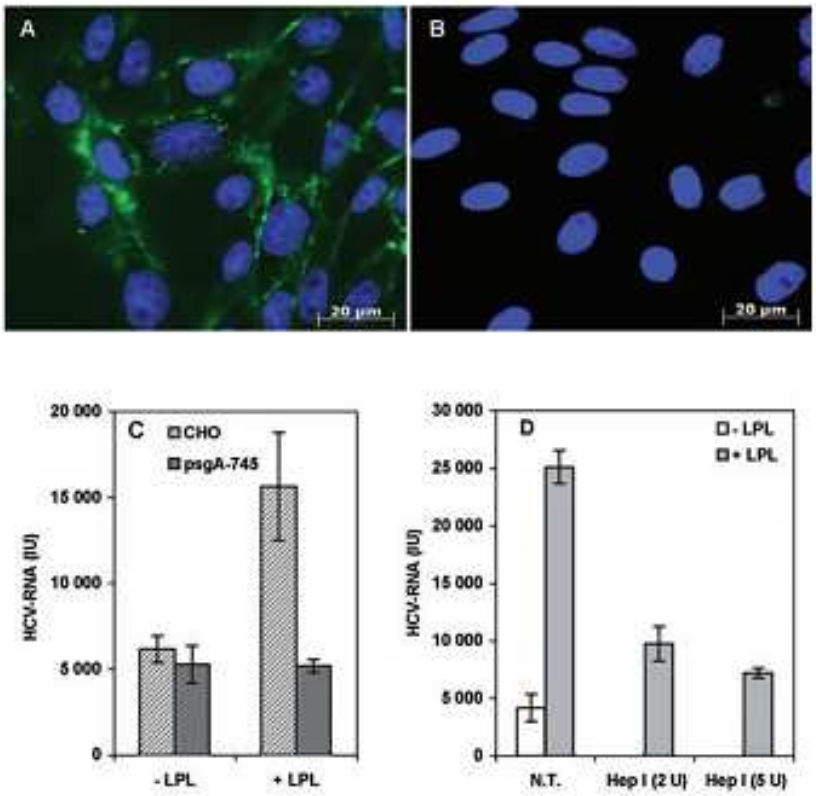


Fig. 3. LPL-mediated cellular uptake of HCV depends on the presence of HSPG on the cell surface.
A and B. LPL binds to HSPG-expressing CHO cells (A), but not to HSPG-deficient CHO-psgA-745 cells (B). CHO cells were incubated with 1 µg ml^{-1} LPL and then with mAb 5D2 followed by Alexa 488-labelled anti-mouse IgG.
C. LPL mediates HCV association with wild-type CHO cells, but not with HSPG-deficient CHO psgA-745 cells.
D. Treatment of CHO cells with 2–5 U of heparinase I for 30 min at 37°C impairs HCV association with cells. Non-treated cells (N.T.) are also shown.

enhance virus binding and uptake. We induced LPL production by THP1-derived macrophages with dexamethasone, known to upregulate LPL production (Domin *et al.*, 1991). Immunofluorescence studies confirmed that dexamethasone-induced macrophages expressed higher levels of LPL than unstimulated cells (Fig. 4A and B). Induction with dexamethasone also enhanced binding of HCV with these cells (Fig. 4C). Binding was inhibited by mAb 5D2 whereas control mouse IgG had no effect (Fig. 4D).

When dexamethasone-induced cells were treated with heparin, which removes LPL bound to HSPG, significantly smaller amounts of HCV remained associated with treated than with non-treated cells (not shown). These findings indicated that LPL produced by human macrophages mediates HCV uptake into these cells by interacting with HSPG on the cell surface.

The dimeric and enzymatically active form of LPL mediates HCV/cell interaction

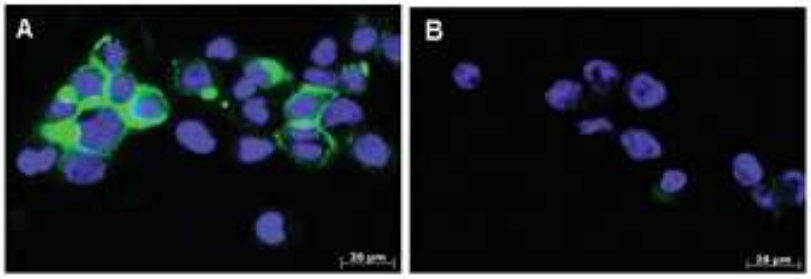
The dimeric form of LPL is enzymatically active and acts as a bridge between lipoproteins and cell surface HSPG, whereas the monomeric form has neither of these properties (Krapp *et al.*, 1995; Chang *et al.*, 1998; Lookene *et al.*, 2004). We investigated whether enzymatic activity is required for virus binding and uptake into cells. For this purpose, we used the specific inhibitor tetrahydrolipstatin (THL), which covalently binds to LPL and blocks its enzymatic activity without affecting the dimeric structure (Lookene *et al.*, 1994). THL inhibited the LPL-mediated virus interaction with CHO cells (Fig. 5A), hepatoma cells (Fig. 5B) and with dexamethasone-stimulated macrophages (Fig. 5C). Nevertheless, THL inactivated LPL remained dimeric, as determined by sandwich ELISA (data not shown). Monomerization of the enzyme, evidenced by ELISA, also impaired the effect of LPL on HCV cellular uptake (data not shown).

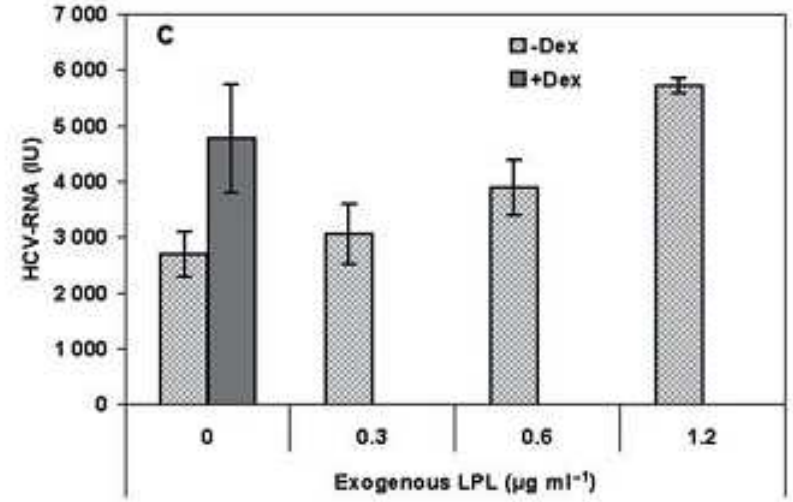
These findings support the contention that dimeric and catalytically active LPL mediates interaction of HCV with different types of cells by forming a bridge between HSPG and lipoprotein-associated HCV.

LPL inhibits HCVcc infection

Using JFH1 strain of HCVcc we investigated whether exogenous LPL could influence HCV infection. HCVcc binding to Huh-7.5 cells was enhanced two- to threefold by LPL (Fig. 6A). To assess the influence of LPL on cell infection, we incubated Huh-7.5 cells with LPL before infection with JFH1 and we determined the level of virus production by quantitative reverse transcription poly-

© 2007 The Authors





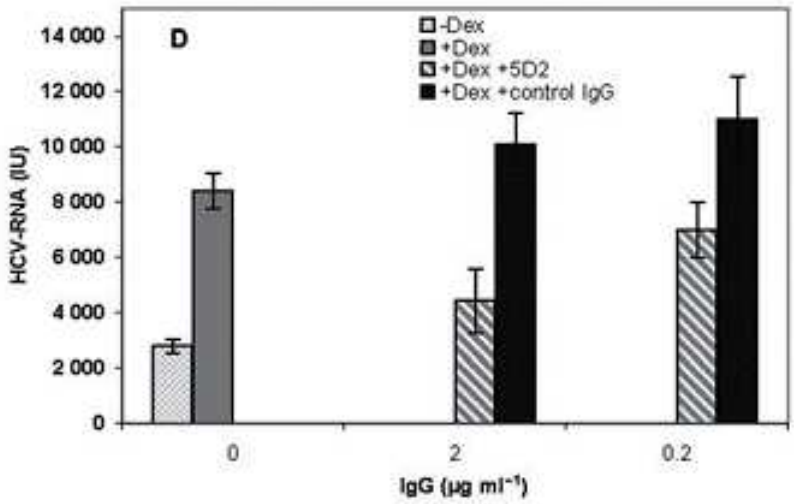


Fig. 4. Endogenously produced human LPL enhances HCV association with THP1-derived macrophages.
A and B. THP1 cells were treated with PMA to induce differentiation into macrophages. These macrophages were stimulated with dexamethasone, resulting in their production of higher levels of LPL (A) than non-stimulated cells (B). LPL was detected by staining with mAb 5D2, followed by Alexa 488-labelled anti-mouse IgG.
C. Human endogenous LPL produced by dexamethasone-stimulated macrophages enhanced HCV association with cells similarly to what was observed with unstimulated cells following addition of exogenous bovine LPL (0.3–1.20 µg ml^{-1}).
D. mAb 5D2 inhibited LPL-mediated HCV uptake into THP1-derived macrophages. THP1-derived macrophages were treated with dexamethasone and incubated with various concentrations of mAb 5D2 (0.2–2 µg ml^{-1}) or with control antibodies before incubation with HCV-positive sera.

merase chain reaction (qRT-PCR) at various time points after infection. In the presence of enzymatically active LPL, the levels of HCV-RNA in infected cells were significantly lower (up to 100-fold) than in controls. If the catalytic activity of LPL was blocked with THL, infection levels were similar to those in the absence of LPL (Fig. 6B). LPL did not affect postentry steps, as THL added 2 h post infection could not restore HCV infectivity. Also LPL added after cell infection did not induce any inhibitory effect (data not shown). Anti-LPL mAb 5D2 interfering with LPL enzymatic activity and bridging capacity prevented negative effect of LPL on HCVcc infectivity (Fig. 6C). In addition, LPL from *Pseudomonas* sp., which did not affect virus binding to cells, also did

© 2007 The Authors

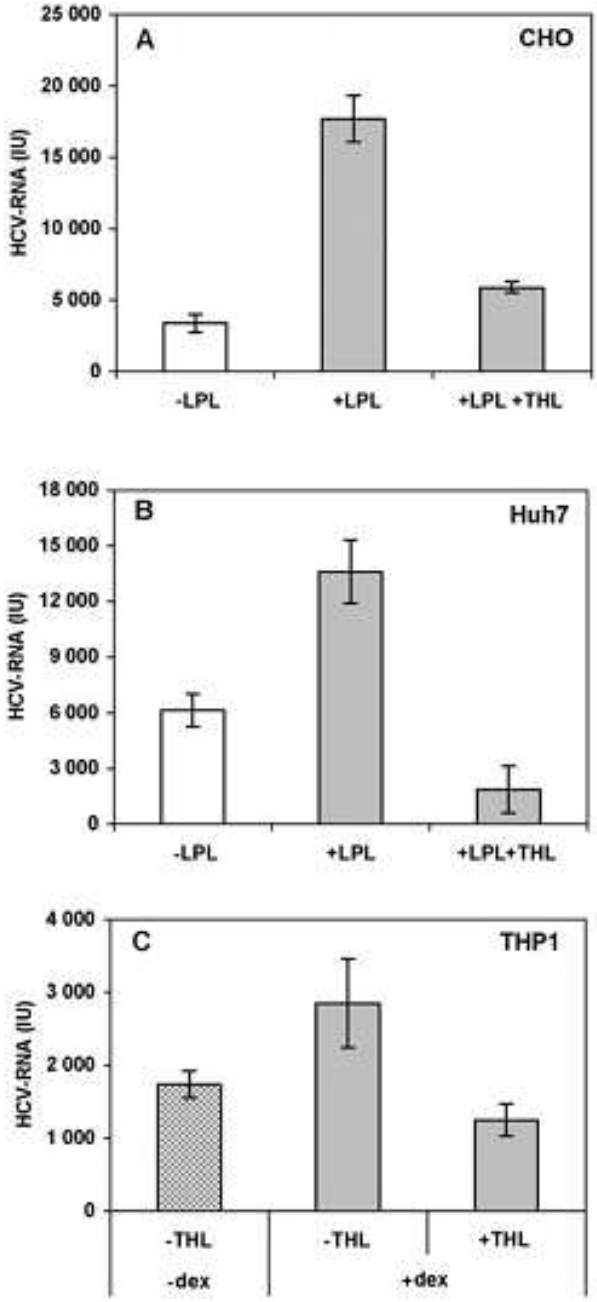


Fig. 5. Dimeric and enzymatically active LPL mediates HCV cellular uptake. THL inhibits LPL-mediated HCV uptake to CHO cells (A) and Huh7 cells (B) and THP1-derived macrophages (C). LPL was treated with 25 μg ml^{-1} THL before incubation with cells and then cells were incubated with HCV-positive serum samples (A and B). THP1-derived macrophages producing endogenous LPL were incubated with HCV-positive serum samples for 2 h at 37°C in the presence or absence of 25 μg ml^{-1} THL.

not inhibit HCVcc infection (not shown). These data clearly showed that inhibitory effect on HCV infection was induced by membrane-associated and catalytically active bovine LPL.

To exclude the possibility that the inhibitory effect of LPL on HCVcc infectivity could be due to the direct virolytic action of LPL, we investigated the infectious potential of JFH1 after incubation of the virus with LPL *in vitro* for 1, 2 or 4 h prior the cell infection. The obtained results (Fig. 6D) showed that the pre-incubation of HCVcc with LPL only slightly affected its infectivity as compared with the pronounced effect of LPL on HCVcc infection produced by LPL associated with cell membrane.

The substantial effect of LPL suggested that lipoproteins associated to virus particles could play an essential role in HCVcc infection. Indeed, anti-β-lipoprotein antibodies (reactive with ApoB, VLDL and LDL) inhibited HCVcc infection by 70% (Fig. 6E), whereas normal goat serum and polyclonal HDL-specific antibodies had no effect (data not shown). In control experiments HCIG, a preparation of immunoglobulins from sera of HCV-infected patients, containing neutralizing anti-HCV antibodies (Yu *et al.*, 2004), inhibited HCVcc infection by 99% (Fig. 6F).

Collectively, these findings indicated that dimeric and enzymatically active LPL bound to cell membranes increases HCV uptake but decreases productive HCV infection.

Discussion

This study demonstrates that LPL, a key enzyme in metabolism of lipoproteins that hydrolyses TRL and directs TRL to the liver, mediates binding and cellular uptake of HCV by mechanisms similar to hepatic clearance of lipoproteins from the circulation. Our findings show also that LPL inhibits HCVcc infection and suggest that LPL could modulate HCV infection *in vivo*.

We show here that LPL added as an exogenous ligand to various types of cells, including human hepatoma cells, mediates binding and uptake of HCV to these cells and this process is specifically inhibited by anti-LPL mAb. The interaction of LPL with natural HCV depends on the presence of lipoproteins associated with virus particles and is blocked by anti-β-lipoprotein antibodies. Bovine LPL, homologous to human LPL or human LPL endogenously produced by macrophages, promotes HCV cell association, whereas LPL derived from *Pseudomonas* sp. has neither effect on interaction of HCV with cells nor inhibitory effect on HCV infection.

We show also that HSPG on the cell surface, which plays an essential role in LPL stability and bridging activity (Williams *et al.*, 1992; Berryman and Bensadoun, 1995; Kolset and Salmivirta, 1999), is required for the LPL-mediated HCV interaction with cells: indeed, LPL does not enhance virus attachment to proteoglycan-deficient cells or to heparinase-treated cells. Heparan sulfate proteoglycan has been proposed as a possible attachment receptor

© 2007 The Authors

for natural HCV (Germi *et al.*, 2002), pseudoviral particles bearing E1E2 envelope glycoproteins on their surface (Barth *et al.*, 2003) and is probably involved in cell infection by HCVcc (Koutsoudakis *et al.*, 2006). Our findings indicate that HCV can also bind to cell surface HSPG indirectly, through LPL.

The dimeric structure of LPL is required for the enzyme to act as a bridge between lipoproteins and HSPG for the hepatic clearance of lipoproteins (Heeren *et al.*, 2002). Correspondingly, we showed that monomerization of the enzyme impaired the effect of LPL on HCV cellular uptake. We found also that THL, a specific inhibitor that covalently binds to the LPL active site without affecting the dimeric structure of the enzyme (Lookene *et al.*, 1994), inhibits the LPL-mediated interaction of natural virus with CHO cells, hepatoma cells and THP1-derived macrophages. These results indicate that both the dimeric structure and the catalytic activity of LPL are critical for LPL-mediated interaction of HCV with cells.

Surprisingly, LPL induced significant inhibition (up to 100-fold) of HCVcc infection *in vitro*. The infectivity of HCVcc returned to normal levels in the presence of THL-inactivated LPL, indicating that LPL enzymatic activity was required to produce inhibitory effect on cell infection. LPL affected early steps of infection, as the effect induced by LPL was not sensitive to THL added 2 h after infection. Also LPL added after cell infection did not induce any inhibitory effect. Moreover, anti-LPL antibody, which interferes with LPL catalytic activity and bridging capacity, suppressed the effect of LPL on virus infection. We considered the possibility that the impaired HCV infection could result from virolytic action of LPL on HCV, as described for LPL from *Pseudomonas* sp. (Thomssen and Bonk, 2002). However, we did not observed a significant effect of LPL on HCVcc infectivity when the virus was pre-incubated with LPL up to 4 h at 37°C before cell infection. In addition, the induced effects were specific for bovine LPL, which is highly homologous to human enzyme, as LPL from *Pseudomonas* sp. did not affect either virus binding to cells or HCVcc infection. Collectively these data showed that the effect of LPL on HCVcc infectivity was produced by bovine LPL associated with cell membranes through mechanisms similar to the LPL-mediated lipoprotein uptake.

We show herein that lipoproteins associated to natural virus are essential for its interaction with LPL. It is well established that the majority of natural HCV is associated with lipoproteins and that lipoproteins are critical for HCV infectivity (Bradley *et al.*, 1991). Interestingly, we show that lipoproteins are required for HCVcc infectivity. Indeed, we could block infection by 70% with antibodies directed to ApoB-containing lipoproteins: VLDL, LDL and ApoB, but not with anti-HDL antibodies. These anti-β-lipoprotein antibodies in our previous studies inhibited the interaction of natural virus with hepatoma cells and SR-BI/Cla1 (Maillard *et al.*, 2006). Thus, both natural and *in vitro* produced viruses require ApoB-containing lipoproteins for cell infection and both have a capacity to interact with LPL. These data are in agreement with recent observations that infectious HCVcc particles produced *in vitro* and released to the supernatant from infected cells are associated with lipoproteins (Gastaminza *et al.*, 2006) and that HCV production is dependent on assembly and secretion of VLDL (Huang *et al.*, 2007). Nevertheless, it is conceivable that the differences might exist between virus produced during natural infection and HCVcc in terms of composition of virus particles and their association with lipoproteins. Indeed, HCV J6/JFH1 recovered from infected animals had lower buoyant density and much higher infectivity than the same virus strain initially produced in Huh-7.5 cells (Lindenbach *et al.*, 2006). In addition, changes in viral density (from low to higher density) occur during persistent HCVcc infection *in vitro* (Zhong *et al.*, 2006) and during evolution from acute to chronic phase of disease in HCV-infected individuals (Watson *et al.*, 1996). Collectively our observations raise the possibility that LPL could have a modulatory effect on HCV infectivity *in vivo* that could depend on the composition of virus-associated lipoproteins.

The exact mechanisms of action of LPL on HCV cell entry and its impact on HCV cell infection require further studies. Based on our current results we speculate that LPL could stimulate a non-productive route of HCV cell entry leading to virus degradation. In this mechanism, the lipolytic activity of LPL may be needed to transform HCV-associated TRL into lipoprotein remnants, thus facilitating their binding and uptake through receptors of the LDL-R family. Alternatively HSPG alone may bind LPL–virus complexes, leading to direct endocytosis through the HSPG-metabolic pathway independent of other hepatic receptors. Recently, in collaboration with other groups we showed that LPL could also play a role in the early steps of cell infection with other hepatotropic virus – hepatitis B virus (Deng *et al.*, 2007).

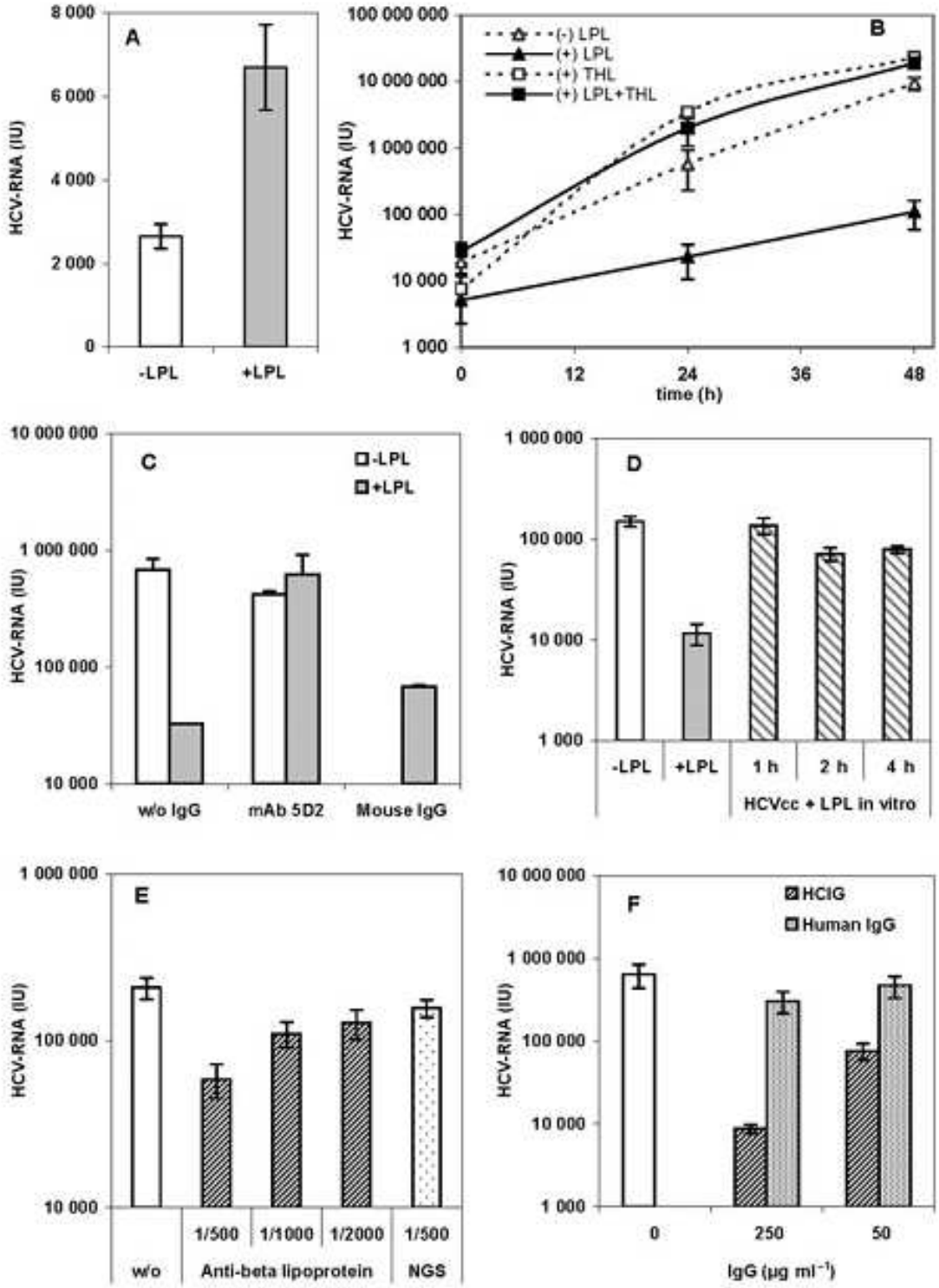
In addition, due to its capacity to interact with different types of cells, LPL could play a role in viral evasion mechanism by facilitating virus uptake into various human cells non-sensitive to infection, conferring protection against host immune responses, and assuring virus survival and transport to permissive cells. These mechanisms would favour conditions leading to persistent HCV infection.

Experimental procedures

Cells

CHO-K1 cells and HSPG-deficient CHO pgsA-745 cells (LGC Promochem, Molsheim, France) were cultured under standard conditions in F12 (HAM) medium (Invitrogen, France), human

© 2007 The Authors



Huh7 hepatoma cells in DMEM, and THP1 cells in RPMI 1640. Huh-7.5 cells were cultured in DMEM supplemented with pyruvate and with 1% non-essential amino acids. All media were supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), glutamine, antibiotics and antifungal agents.

Reagents and antibodies

Bovine lipoprotein lipase and *Pseudomonas* sp. lipoprotein lipase, heparin, heparinase I, anti-human β-lipoprotein antibodies (specific to VLDL, LDL and ApoB) were purchased from Sigma

© 2007 The Authors

Fig. 6. LPL inhibits HCVcc infection.
A. LPL enhances uptake of HCVcc to hepatoma cells. Huh-7.5 cells were incubated with LPL for 30 min at 4°C and then with HCVcc for 2 h at 37°C. After washing, HCV-RNA associated with cells was quantified by qRT-PCR.
B. LPL significantly inhibits HCVcc infection but inactivation of LPL enzymatic activity by THL restores HCV infection. Cells were inoculated with approximately 5×10^5 IU of viral stock in the absence (open symbols) or in the presence (black symbols) of 1 μg ml^{-1} LPL and in the absence (triangles) or presence (squares) of 50 μg ml^{-1} THL. HCV-RNA was quantified 0, 24 and 48 h post infection.
C. The inhibitory effect of LPL is prevented by anti-LPL mAb 5D2. Cells were incubated with 1 μg ml^{-1} LPL in the presence of 5 μg ml^{-1} anti-LPL mAb 5D2 or mouse IgG and then incubated for 2 h at 37°C with HCVcc. HCV-RNA was quantified 48 h after infection.
D. Inhibition of infection is not due to a direct virolytic effect of LPL. HCVcc was incubated for 1, 2 or 4 h with 1 μg ml^{-1} LPL *in vitro* prior to addition of THL to stop LPL enzymatic activity. Then the mixture was added to cells and incubated for 2 h at 37°C. HCV-RNA was quantified 24 h after cell infection. JFH1 incubated for 4 h at 37°C without LPL (white bar), with LPL bound to cells (grey bar) or pre-incubated with LPL *in vitro* for 1, 2 or 4 h (hatched bars) are shown.
E. Inhibition of HCVcc infection with anti-β-lipoprotein antibodies. HCVcc was incubated with anti-β-lipoprotein antibodies diluted in normal goat serum (NGS) at indicated concentrations before and during cell infection.
F. Inhibition of HCVcc infection with HCIG. HCIG was used at indicated concentrations and normal human IgG at a concentration of 250 μg ml^{-1}. HCV-RNA associated with cells was quantified by qRT-PCR 24 h after infection.

(St. Quentin Fallavier, France) and anti-α-lipoprotein (anti-HDL) antibodies were from Tebu, France. THL (Xenical®) was from Roche Pharmaceuticals. The anti-LPL mAb 5D2 (Liu *et al.*, 1992; Chang *et al.*, 1998) was kindly provided by Dr J. Brunzell from the University of Washington, Seattle, USA.

Preparation of HCIG (HCV-Imunoglobulins) was kindly provided by A. Fattum (Nabi Biopharmaceutical, Rockville, MD, USA). Immunoglobulins were prepared from 190 of anti-HCV-positive plasma samples from donated blood, and had high titres of anti-E2, anti-E1 and anti-core antibodies; HCV-RNA was eliminated during the preparation procedure.

Serum samples

Serum samples were obtained from volunteer blood donors or from chronic HCV carriers. All serum samples tested positive for anti-HCV antibodies by MONOLISA anti-HCV PLUS (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France) and RIBA (ORTHO Diagnostics) and for HCV-RNA by b-DNA assay (Chiron). Viral load in serum samples was quantified by b-DNA technology (Bayer Diagnostics).

The serum lipoprotein and cholesterol concentrations in sera were determined by colorimetric and enzymatic tests carried out by the Pasteur CERBA Laboratory (Cergy Pontoise, France).

Differentiation of monomeric and dimeric LPL by ELISA

Dimeric LPL was distinguished from monomeric by sandwich ELISA with the anti-LPL mAb 5D2; only the dimeric form of LPL is detected with this antibody when it is used for capture and LPL detection (Peterson *et al.*, 1992). Direct ELISA with LPL-coated polyvinyl plates and HRPO-labelled mAb 5D2 was used for detection of monomeric and dimeric LPL.

Binding and uptake of HCV into cells

Confluent monolayers of adherent cells were grown for 48 h in six-well tissue culture plates to obtain approximately 1×10^6 cells well^{-1}. The cells were washed with cold medium without FCS and incubated with bovine LPL in concentrations ranging from 1 to 10 μg ml^{-1} for 30 min at 4°C; 100 μl of HCV-positive serum or 100 μl of a 1/100 dilution of JFH1 stock was then added and the cells were incubated for 1 h at 4°C, followed by incubation for 30 min at 37°C.

THP1 cells were induced to differentiate into macrophages by incubation with 0.16 μM phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Sigma) in complete medium. THP1-derived macrophages were incubated with 50 nM dexamethasone for 16 h to induce LPL expression (Makoveichuk *et al.*, 2004).

Virus was incubated with cells in the presence of LPL and 50 μg ml^{-1} THL to study the effect of the enzymatic LPL activity for virus uptake. To study the role of HSPG in virus uptake cells were treated either with 10 μg ml^{-1} heparin for 30 min at 4°C or with heparinase I (2–5 units ml^{-1}) for 1 h at 37°C, then washed and incubated with LPL and HCV-positive samples as described above. The cells were washed with media to remove unbound HCV, total RNA was extracted, and HCV-RNA levels were determined by qRT-PCR. All assays were performed at least in triplicates.

Infection of cells with the JFH1 strain of HCV

The plasmid JFH-1, encoding the genome of the JFH-1 strain, was kindly provided by T. Wakita (Wakita *et al.*, 2005) and was used to generate HCVcc. The virus was cultured as described previously (Wakita *et al.*, 2005) to obtain a viral stock of approximately 5×10^7 UI ml^{-1}.

To investigate the influence of LPL on cell infection, LPL (1 μg ml^{-1}) was pre-incubated with cells as for binding studies or diluted in a medium containing 50 μg ml^{-1} THL, 5 μg ml^{-1} mAb 5D2. In inhibition experiments with HCIG or anti-lipoprotein antibodies the reagents were used in indicated concentrations and were present in culture medium during cell infection with HCVcc.

Real-time qRT-PCR

The HCV-RNA associated with cells was quantified by one-step real-time qRT-PCR with the SuperScript®™ III Platinum® One-Step qRT-PCR Kit (Invitrogen) as described previously (Maillard *et al.*,2006). The primers 5′-TCCCGGGAGAGCCATAGTG-3′ and 5′-TCCAAGAAAGGACCCGGTC-3′ were used to amplify HCV-RNA from the JFH-1 clone, and 6-FAM-TCTGCGGAACCGGT G-MGB (Applied Biosystems) was used as an internal probe. Real-time detection of the PCR products was carried out with an AbiPrism 7700. HCV-RNA was quantified relative to a reference serum, standardized with an HCV-RNA quantification panel from AcroMetrix (Berkeley, CA) and values were expressed in IU.

© 2007 The Authors

Immunofluorescence microscopy

For LPL expression analysis, THP1-derived macrophages were washed with serum-free medium, fixed in 4% paraformaldehyde in PBS and quenched with 50 mM NH_4Cl. The cells were then incubated with 10 μg ml^{-1} mAb 5D2 at room temperature for 1 h and washed with PBS containing 0.5% Tween 20. Bound antibody was detected with Alexa 488-labelled goat anti-mouse IgG (Molecular Probes, Invitrogen, France). The cells were washed with PBS containing 0.5% Tween 20, mounted in Vectashield mounting medium (Vector Laboratories, UK) and examined under a fluorescence microscope (Zeiss Axiovert 200M) equipped with the ApoTome system.

Statistical analyses

Three groups were defined as follows: group 1 for Huh7 cells inoculated in the absence of LPL ($n = 12$), group 2 for Huh7 cells inoculated in the presence of bovine LPL ($n = 10$) and group 3 for Huh7 cells inoculated in the presence of LPL from *Pseudomonas* sp. ($n = 9$). Virus association with cells was compared among the three groups by the non-parametric Kruskal–Wallis test for the overall comparison, and by the Mann–Whitney *U*-test for the two-by-two comparisons.

Acknowledgements

We thank John Chapman and Thierry Huby for valuable discussions and Arnaud Fontanet for help in statistical analyses. We also thank T. Wakita for providing the JFH1 clone and John Brunzell for providing mAb 5D2 and Ali Fattum for HCIG. We express our gratitude to S. Ottone for technical assistance and Emmanuelle Perret for help in immunofluorescence microscopy. This work was funded by a grant from the ANRS. Ursula Andréo was supported by a fellowship grant from the ANRS and CANAM. Olga Kalinina and Marine Wallic were supported by fellowship grants from ANRS.

References

Agnello, V., Abel, G., Elfahal, M., Knight, G.B., and Zhang, Q.X. (1999) Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 12766–12771.

André, P., Komurian-Pradel, F., Deforges, S., Perret, M., Berland, J.L., Sodoyer, M., *et al.* (2002) Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles. *J Virol* **76**: 6919–6928.

André, P., Perlemuter, G., Budkowska, A., Brechot, C., and Lotteau, V. (2005) Hepatitis C virus particles and lipoprotein metabolism. *Semin Liver Dis* **25**: 93–104.

Barth, H., Schafer, C., Adah, M.I., Zhang, F., Linhardt, R.J., Toyoda, H., *et al.* (2003) Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate. *J Biol Chem* **278**: 41003–41012.

Bartosch, B., Vitelli, A., Granier, C., Goujon, C., Dubuisson, J., Pascale, S., *et al.* (2003) Cell entry of hepatitis C virus requires a set of co-receptors that include the CD81 tetraspanin and the SR-B1 scavenger receptor. *J Biol Chem* **278**: 41624–41630.

Berryman, D.E., and Bensadoun, A. (1995) Heparan sulfate proteoglycans are primarily responsible for the maintenance of enzyme activity, binding, and degradation of lipoprotein lipase in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* **270**: 24525–24531.

Bradley, D., McCaustland, K., Krawczynski, K., Spelbring, J., Humphrey, C., and Cook, E.H. (1991) Hepatitis C virus: buoyant density of the factor VIII-derived isolate in sucrose. *J Med Virol* **34**: 206–208.

Casaroli-Marano, R.P., Garcia, R., Vilella, E., Olivecrona, G., Reina, M., and Vilaro, S. (1998) Binding and intracellular trafficking of lipoprotein lipase and triacylglycerol-rich lipoproteins by liver cells. *J Lipid Res* **39**: 789–806.

Chang, S.F., Reich, B., Brunzell, J.D., and Will, H. (1998) Detailed characterization of the binding site of the lipoprotein lipase-specific monoclonal antibody 5D2. *J Lipid Res* **39**: 2350–2359.

Cormier, E.G., Tsamis, F., Kajumo, F., Durso, R.J., Gardner, J.P., and Dragic, T. (2004) CD81 is an entry coreceptor for hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 7270–7274.

Deng, Q., Zhai, J.W., Michel, M.L., Zhang, J., Qin, J., Kong, Y.Y., *et al.* (2007) Identification and characterization of peptides that interact with hepatitis B virus via the putative receptor binding site. *J Virol* **81**: 4244–4254.

Domin, W.S., Chait, A., and Deeb, S.S. (1991) Transcriptional activation of the lipoprotein lipase gene in macrophages by dexamethasone. *Biochemistry* **30**: 2570–2574.

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

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

Germi, R., Crance, J.M., Garin, D., Guimet, J., Lortat-Jacob, H., Ruigrok, R.W., *et al.* (2002) Cellular glycosaminoglycans and low density lipoprotein receptor are involved in hepatitis C virus adsorption. *J Med Virol* **68**: 206–215.

Heeren, J., Niemeier, A., Merkel, M., and Beisiegel, U. (2002) Endothelial-derived lipoprotein lipase is bound to postprandial triglyceride-rich lipoproteins and mediates their hepatic clearance *in vivo*. *J Mol Med* **80**: 576–584.

Hide, W.A., Chan, L., and Li, W.H. (1992) Structure and evolution of the lipase superfamily. *J Lipid Res* **33**: 167–178.

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

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

Kolset, S.O., and Salmivirta, M. (1999) Cell surface heparan

© 2007 The Authors

sulfate proteoglycans and lipoprotein metabolism. *Cell Mol Life Sci* **56**: 857–870.

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

Krapp, A., Zhang, H., Ginzinger, D., Liu, M.S., Lindberg, A., Olivecrona, G., *et al.* (1995) Structural features in lipoprotein lipase necessary for the mediation of lipoprotein uptake into cells. *J Lipid Res* **36**: 2362–2373.

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

Lindenbach, B.D., Meuleman, P., Ploss, A., Vanwolleghem, T., Syder, A.J., McKeating, J.A., *et al.* (2006) Cell culture-grown hepatitis C virus is infectious *in vivo* and can be recultured *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 3805–3809.

Liu, M.S., Ma, Y., Hayden, M.R., and Brunzell, J.D. (1992) Mapping of the epitope on lipoprotein lipase recognized by a monoclonal antibody (5D2) which inhibits lipase activity. *Biochim Biophys Acta* **1128**: 113–115.

Lookene, A., Skottova, N., and Olivecrona, G. (1994) Interactions of lipoprotein lipase with the active-site inhibitor tetrahydrolipstatin (Orlistat). *Eur J Biochem* **222**: 395–403.

Lookene, A., Zhang, L., Hultin, M., and Olivecrona, G. (2004) Rapid subunit exchange in dimeric lipoprotein lipase and properties of the inactive monomer. *J Biol Chem* **279**: 49964–49972.

Lozach, P.Y., Lortat-Jacob, H., de Lacroix de Lavalette, A., Staropoli, I., Foung, S., Amara, A., *et al.* (2003) DC-SIGN and L-SIGN are high affinity binding receptors for hepatitis C virus glycoprotein E2. *J Biol Chem* **278**: 20358–20366.

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

Maillard, P., Krawczynski, K., Nitkiewicz, J., Bronnert, C., Sidorkiewicz, M., Gounon, P., *et al.* (2001) Nonenveloped nucleocapsids of hepatitis C virus in the serum of infected patients. *J Virol* **75**: 8240–8250.

Makovelchuk, E., Castel, S., Villaro, S., and Olivecrona, G. (2004) Lipoprotein lipase-dependent binding and uptake of low density lipoproteins by THP-1 monocytes and macrophages: possible involvement of lipid rafts. *Biochim Biophys Acta* **1686**: 37–49.

Masciopinto, F., Giovani, C., Campagnoli, S., Galli-Stampino, L., Colombatto, P., Brunetto, M., *et al.* (2004) Association of hepatitis C virus envelope proteins with exosomes. *Eur J Immunol* **34**: 2834–2842.

Mead, J.R., Irvine, S.A., and Ramji, D.P. (2002) Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease. *J Mol Med* **80**: 753–769.

Merkel, M., Heeren, J., Dudeck, W., Rinninger, F., Radner, H., Breslow, J.L., *et al.* (2002) Inactive lipoprotein lipase (LPL) alone increases selective cholesterol ester uptake *in vivo*, whereas in the presence of active LPL it also increases triglyceride hydrolysis and whole particle lipoprotein uptake. *J Biol Chem* **277**: 7405–7411.

Monazahian, M., Kippenberger, S., Muller, A., Seitz, H., Bohme, I., Grethe, S., and Thomssen, R. (2000) Binding of human lipoproteins (low, very low, high density lipoproteins) to recombinant envelope proteins of hepatitis C virus. *Med Microbiol Immunol (Berl)* **188**: 177–184.

Penin, F., Dubuisson, J., Rey, F.A., Moradpour, D., and Pawlotsky, J.M. (2004) Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology* **39**: 5–19.

Peterson, J., Fujimoto, W.Y., and Brunzell, J.D. (1992) Human lipoprotein lipase: relationship of activity, heparin affinity, and conformation as studied with monoclonal antibodies. *J Lipid Res* **33**: 1165–1170.

Petit, M.A., Lievre, M., Peyrol, S., De Sequeira, S., Berthillon, P., Ruigrok, R.W., and Trepo, C. (2005) Enveloped particles in the serum of chronic hepatitis C patients. *Virology* **336**: 144–153.

Pileri, P., Uematsu, Y., Campagnoli, S., Galli, G., Falugi, F., Petracca, R., *et al.* (1998) Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* **282**: 938–941.

Prince, A.M., Huima-Byron, T., Parker, T.S., and Levine, D.M. (1996) Visualization of hepatitis C virions and putative defective interfering particles isolated from low-density lipoproteins. *J Viral Hepat* **3**: 11–17.

Scarselli, E., Ansuini, H., Cerino, R., Roccasecca, R.M., Acali, S., Filocamo, G., *et al.* (2002) The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J* **21**: 5017–5025.

Seo, T., Al-Haideri, M., Treskova, E., Worgall, T.S., Kako, Y., Goldberg, I.J., and Deckelbaum, R.J. (2000) Lipoprotein lipase-mediated selective uptake from low density lipoprotein requires cell surface proteoglycans and is independent of scavenger receptor class B type 1. *J Biol Chem* **275**: 30355–30362.

Thomssen, R., and Bonk, S. (2002) Virolytic action of lipoprotein lipase on hepatitis C virus in human sera. *Med Microbiol Immunol (Berl)* **191**: 17–24.

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

Wakita, T., Pietschmann, T., Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., *et al.* (2005) Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* **11**: 791–796.

Watson, J.P., Bevitt, D.J., Spickett, G.P., Toms, G.L., and Bassendine, M.F. (1996) Hepatitis C virus density heterogeneity and viral titre in acute and chronic infection: a comparison of immunodeficient and immunocompetent patients. *J Hepatol* **25**: 599–607.

Williams, K.J., Fless, G.M., Petrie, K.A., Snyder, M.L., Brocia, R.W., and Swenson, T.L. (1992) Mechanisms by which lipoprotein lipase alters cellular metabolism of lipoprotein(a), low density lipoprotein, and nascent lipoproteins. Roles for low density lipoprotein receptors and heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem* **267**: 13284–13292.

© 2007 The Authors

Yu, M.Y., Bartosch, B., Zhang, P., Guo, Z.P., Renzi, P.M., Shen, L.M., *et al.* (2004) Neutralizing antibodies to hepatitis C virus (HCV) in immune globulins derived from anti-HCV-positive plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 7705–7710.

Zhong, J., Gastaminza, P., Cheng, G., Kapadia, S., Kato, T., Burton, D.R., *et al.* (2005) Robust hepatitis C virus infection *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 9294–9299.

Zhong, J., Gastaminza, P., Chung, J., Stamataki, Z., Isogawa, M., Cheng, G., *et al.* (2006) Persistent hepatitis C virus infection *in vitro*: coevolution of virus and host. *J Virol* **80**: 11082–11093.

© 2007 The Authors

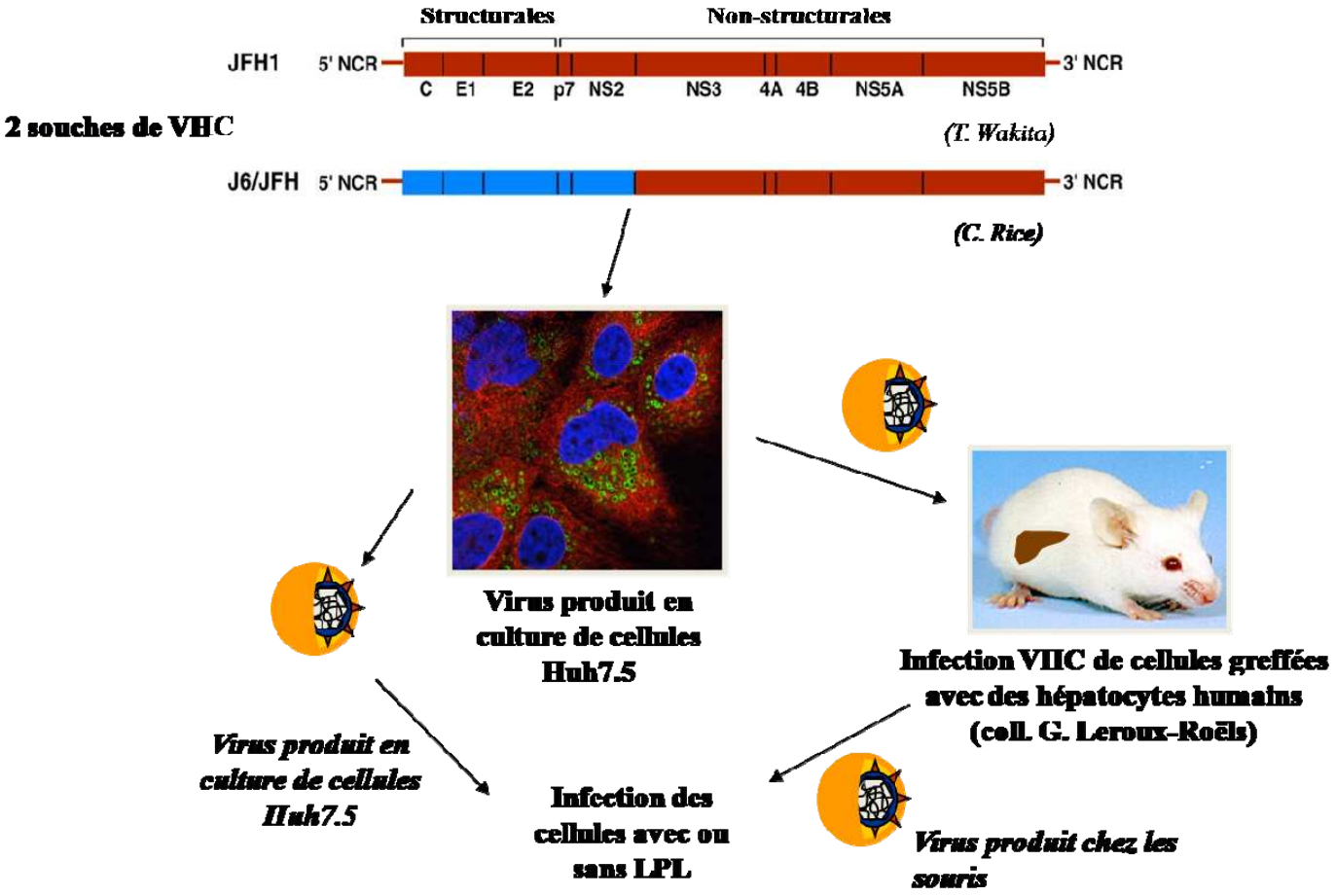


Figure 33 : Approche expérimentale pour l'étude du rôle de la LPL sur l'infection par le VHC, *in vitro* et *in vivo*

Face aux résultats obtenus pour le virus sérique et aux observations préliminaires concernant l'action de la LPL sur l'infection par le HCVcc, il nous a paru important d'examiner les effets de la LPL sur l'infection des cellules hépatiques dans des conditions plus proches des conditions physiologiques.

La lignée hépatocytaire Huh7 et ses dérivés ont en effet des caractéristiques très éloignées de celles des hépatocytes humains, cellules quiescentes hautement différenciées. Elles ont perdu une grande partie de leur phénotype hépatocytaire. Leur prolifération est anormale, leur expression génique dérégulée, elles présentent des dysfonctions mitochondriales, une endocytose et des voies de signalisation aberrantes, de profondes modifications de la sécrétion de VLDL et une faible production d'IFNβ (Buck 2008). Les souris humanisées représentent par conséquent le seul modèle *in vivo* d'infection par le VHC mimant l'infection naturelle d'hépatocytes humains primaires différenciés avec un métabolisme lipidique normal. Les souris uPA-SCID sont transgéniques pour un gène provoquant la surexpression dans le foie d'un activateur du plasminogène. Ces souris sont croisées avec des souris immuno-déficientes SCID, permettant la greffe d'hépatocytes humains et conférant un avantage réplicatif aux hépatocytes transplantés. Ces souris, dites « humanisées », peuvent être facilement infectées par le VHC (Figure 33).

Dans cette étude, nous avons donc recherché dans des modèles de réplication du VHC *in vitro* et *in vivo* si la LPL peut effectivement agir comme un inhibiteur de l'infection par le VHC. Nous avons ainsi utilisé deux souches virales, JFH-1 et J6/JFH-1, pour analyser l'effet de la LPL sur deux types de virus se répliquant facilement *in vitro*. Les résultats obtenus ont montré que la LPL inhibe de façon significative (jusqu'à 90%) l'infection des cellules Huh7.5 par les souches virales JFH-1 et J6/JFH-1 produites en culture cellulaire. Pour répondre à la question de l'influence de la LPL sur l'infection par ces mêmes virus produits dans les hépatocytes primaires, dans des conditions plus physiologiques, les mêmes souches de HCVcc ont été injectées aux souris uPA-SCID humanisées. Nos résultats montrent que la LPL exerce le même effet inhibiteur sur les souches virales produites dans des hépatocytes humains primaires greffés chez les souris uPA-SCID humanisées.
L'analyse des virus produits *in vitro* et *in vivo* devrait répondre à la question quelle population du virus est inhibée par la LPL et si les virus produits *in vitro* et *in vivo* ont les mêmes propriétés physicochimiques. L'ultracentrifugation des échantillons viraux en gradient d'iodixanol révèle que les deux souches JFH-1 et J6/JFH-1 peuvent être séparées en deux

populations, comme le montre la détection de la protéine de capside dans les différentes fractions du gradient. La population « légère » est retrouvée à une densité moyenne de 1,03g/ml alors que la seconde, plus abondante, a une densité moyenne de 1,086g/ml. Ces deux populations colocalisent avec ApoB et le cholestérol et leur densité confirme leur association avec les lipoprotéines. Ces densités sont similaires à celles rapportées pour le virus naturel provenant de sérum de patient infecté (Nielsen et al. 2006) même si les proportions de virus dans ces fractions sont différentes selon les patients. Une distribution similaire d'ApoB et de cholestérol a été retrouvée dans le surnageant de culture de cellules non infectées. Ces données suggèrent que la densité d'une population virale pourrait être liée à la composition en lipoprotéines sécrétées par les cellules produisant le virus. La population de plus faible densité est plus infectieuse que celle de densité plus forte (100 fois pour JFH-1 et 1000 fois pour J6/JFH-1). Néanmoins, ces deux populations virales sont inhibées de la même façon par la LPL, suggérant que la composition lipidique de ces populations virales n'influence pas l'action de la LPL sur l'infectiosité du VHC.

Le pic majeur de virus détecté dans le sérum fractionné provenant des souris uPA-SCID inoculées avec JFH-1 présente une densité plus faible que celle du pic correspondant pour cette même souche virale produite *in vitro* (1,053 vs 1,086g/ml). Ces observations suggèrent que le virus produit *in vivo* pourrait avoir une densité différente de celle du virus produit *in vivo*, en accord avec les observations précédentes (Lindenbach et al. 2006). Néanmoins la densité de la deuxième souche virale, J6/JFH-1, produite chez les souris a la même densité que le virus initial produit dans les cellules Huh7.5, suggérant que la densité du virus dépend également de la composition des glycoprotéines d'enveloppe qui sont différentes pour ces deux virus.

Cette série d'expériences a montré que l'effet délétère de la LPL sur l'infectiosité du virus produit *in vitro* ou *in vivo* ne dépend pas de son activité catalytique, puisque la THL, inhibiteur de l'activité catalytique de l'enzyme, ne modifie pas l'effet de la LPL, aussi bien sur le virus produit *in vitro* qu'*in vivo*. Les différences obtenues dans cette étude comparativement à l'étude précédente pourrait être dues à l'utilisation de la préparation commerciale de THL (le solvant agissait sur l'infection dans l'étude précédente). Des études complémentaires pour expliquer ces observations sont en cours.

Les données des deux articles suggèrent que l'effet de la LPL sur l'infection par le VHC est donc dû à sa fonction de pontage médiant la clearance hépatique des lipoprotéines, et donc

aussi du virus associé aux lipoprotéines. Ces données suggèrent par conséquent que la LPL, indépendamment de son activité enzymatique, pourrait agir comme un inhibiteur naturel de l'infectiosité du VHC selon un mécanisme similaire à celui de la clearance hépatique des lipoprotéines de la circulation. La LPL mène probablement le VHC vers une voie alternative d'entrée dans la cellule, vraisemblablement la voie de dégradation des lipoprotéines, conduisant ainsi à une infection abortive.

Ces résultats font l'objet d'un article actuellement soumis : **« Lipoprotein lipase inhibits cell infection by Hepatitis C Virus produced in cell culture and in uPA-SCID mice engrafted with human primary hepatocytes »** (Walic et al, soumis).

ARTICLE 2

Soumis

Lipoprotein lipase inhibits cell infection by Hepatitis C Virus produced in cell culture and in uPA-SCID mice engrafted with human primary hepatocytes

[1]**Marine Walic***, [1]Patrick Maillard*, [2]Philip Meuleman, [1]Farzin Roohvand, [3]Thierry Huby, [4]Takaji Wakita, [2]Geert Leroux-Roels and [1]Agata Budkowska

* Participated equally in this work

1 Pasteur Institute, Hepacivirus and Innate Immunity, Paris, France

2 Center for Vaccinology, Ghent University and Hospital, Ghent, Belgium;

3 INSERM UMR-S 939, Hôpital de la Pitié, Paris, France;

4 Department of Virology II, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan;

Lipoprotein lipase inhibits cell infection by Hepatitis C Virus produced in cell culture and in uPA-SCID mice engrafted with human primary hepatocytes

[1]Marine Walic*, [1]Patrick Maillard*, [2]Philip Meuleman, [1]Farzin Roohvand, [3]Thierry Huby, [4]Takaji Wakita, [2]Geert Leroux-Roels and [1]Agata Budkowska

* Participated equally in this work

[1] Pasteur Institute, Hepacivirus and Innate Immunity, Paris, France;

Marine Walic, e-mail: marine.walic@pasteur.fr,

Patrick Maillard, e-mail: patrick.maillard@pasteur.fr,

Farzin Roohvand, e-mail: farzin.roohvand@pasteur.fr,

Agata Budkowska, e-mail: agata.budkowska@pasteur.fr,

[2] Center for Vaccinology, Ghent University and Hospital, Ghent, Belgium;

Philip Meuleman, e-mail: philip.meuleman@ugent.be,

Geert Leroux-Roels, e-mail: geert.lerouxroels@ugent.be,

[3] INSERM UMR-S 939, Hôpital de la Pitié, Paris, France;

Thierry Huby, e-mail: thierry.huby@upmc.fr,

[4] Department of Virology II, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan;

Takaji Wakita, e-mail: wakita@nih.go.jp

key words: HCV inhibitor, lipoproteins, receptors, cell culture, hepatoma cells,

Address correspondence to:

Agata Budkowska, PhD,

Hepacivirus and Innate Immunity, Pasteur Institute,

25/28 Rue du Dr Roux, 75724 Paris, France,

Ph : 33 14568 8261

Fax: 33 14061 3012

E-mail: **agata.budkowska@pasteur.fr**,

List of abbreviations:

HCV: Hepatitis C virus; VLDL: very light density lipoproteins; TRL: triglyceride-rich lipoproteins; LVP: lipo-viro-particles; HCVcc: cell culture derived virus; uPA-SCID: urokinase-type plasminogen activator-Severe Combined Immunodeficiency Disorder; Apo: Apolipoprotein; SR-B1: Scavenger receptor B1; LDL-R: low density lipoprotein receptor; HSPG: heparan sulfate proteoglycans; LPL: Lipoprotein lipase; DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium; BSA: bovine serum albumin; FCS: foetal calf serum; qRT-PCR: quantitative reverse transcription polymarase chain reaction; GPDH: Glycerol 3 phosphate dehydrogenase; IU: International unit; THL: tetrahydrolipstatin; PEG: polyethylene-glycol; HEPES: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; GPIHBP1: Glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein-binding protein 1; LRP: low density lipoprotein receptor related protein (LRP); LDL: low density lipoproteins.

Financial support

This work was funded by a grant from the Agence Nationale pour la Recherche sur le Sida et les Hépatites Virales (ANRS), a Concerted Action Grant from UGent (nr 01G00507) and by the Belgian State via the Interuniversity Attraction Poles Program (P6/36-HEPRO). Marine Walic was granted a doctoral fellowship from the ANRS; Farzin Roohvand was supported by a fellowship for foreign scientists from the ANRS. Phillip Meuleman is supported by a postdoctoral fellowship from the Research Foundation - Flanders (FWO-Vlaanderen).

Abstract

Lipoprotein lipase (LPL) hydrolyses circulating trilyceride-rich lipoproteins (TRL) within chylomicrons and very low-density lipoproteins (VLDL), producing fatty acids for peripheral tissues. Independently of its catalytic activity, LPL targets TRL to the liver and mediates their hepatic uptake by receptor-mediated pathways. We have previously shown that LPL mediates the cellular uptake of HCV from patient sera, acting as a bridge between virus-associated lipoproteins and cell surface heparan sulfate. We show here that LPL inhibits by 90% cell infection with JFH-1 and J6/JFH-1 strains produced either in Huh7.5 cells (HCVcc) or chimeric uPA-SCID mice engrafted with primary human hepatocytes (mHCVcc). Viruses produced both *in vitro* and *in vivo* were separated through iodixanol gradients into two populations, banding at low (1.02-1.03g/ml) and high (1.053-1.18g/ml) densities, which co-localised with ApoB and cholesterol. Low-density virus populations were 100-1000 times more infectious than the predominant, high-density species. Infection of Huh7.5 cells with both these virus populations was inhibited by LPL. This deleterious effect on the infectivity of HCV produced *in vitro* or *in vivo* was not dependent on the catalytic activity of LPL, since tetrahydrolipstatin, a lipase inhibitor, did not abrogate the effect of LPL.

Conclusion: Due to the association of HCV with lipoproteins, LPL acts as a natural inhibitor of infectivity of viruses produced *in vitro* and *in vivo*. Since the inhibitory effect of LPL on HCV infection is independent of its catalytic activity, and LPL mediates HCV uptake by mechanisms similar to the hepatic clearance of lipoproteins from the circulation, LPL most probably mediates an alternative route of HCV cell entry that leads to an abortive infection. Virus associated lipoproteins could thus provide a new target for anti-viral approaches.

Hepatitis C virus (HCV) infection remains a major health problem, with 130 million people infected worldwide. In the majority of cases (60-85%), HCV infection progresses to chronic liver disease that can lead to liver cirrhosis and hepatocarcinoma (1). There is still no vaccine available, and current therapy based on pegylated interferon alpha in combination with ribavirin is only effective in about 50 – 80% of patients, depending on the virus genotype (2). A distinctive feature of the HCV life-cycle is that virus RNA replication and virion assembly depend on cholesterol metabolism and fatty acid biosynthesis pathways (3-5). In addition, chronic HCV infection induces changes in host lipid metabolism such as a reduction in serum lipoprotein levels and an accumulation of lipids in liver parenchymal cells (steatosis) (6, 7).

Infectious HCV virus particles are most likely composed of the nucleocapsid surrounded by the lipid envelope into which E1 and E2 glycoproteins are embedded. However HCV particles in the serum have VLDL-like properties (Lipo Viro Particles, LVPs), and are composed of TRL containing ApoB and ApoE, HCV envelope glycoproteins and virus nucleocapsid, (8, 9). LVPs represent unconventional HCV particles and are the most infectious population of HCV, however virus particles that are not associated with lipoproteins (10), non-enveloped nucleocapsids (11), and "exosomes" that bear HCV RNA (12) have all been detected in patient sera.

Recent studies have confirmed that mechanisms of formation and release of infectious HCV require the association of the virion with lipids, and that this follows the secretion pathway of VLDL (3, 5, 13). Accordingly, most HCV circulating in patient sera is of low density (14, 15). The association of lipoproteins with virus particles increases virus infectivity: only low-density HCV is highly infectious in a chimpanzee model (16) and in cell cultures *in vitro* (8, 17). More recently, comparative analyses of the viruses produced in human hepatoma cell lines (HCVcc) that reproduce the complete viral replication cycle, and in chimpanzees or in uPA-SCID mice with human liver grafts, provided evidence that the HCV recovered from experimentally infected animals has a

higher specific infectivity than the same virus strain produced in hepatoma cells *in vitro,* due to the association of virus particles with lipoproteins (18).

Currently available data suggest that the initiation of a productive HCV infection involves several viral and cellular factors that trigger virus uptake into the hepatocyte via tight junctions, and that lipoproteins integrated into virus particles play an important role in this process (for review, see (19). Three of the major molecules mediating HCV cell entry, the scavenger receptor (SB-BI), the LDL-receptor (LDL-R) and heparan sulphate proteoglycans (HSPG) also interact with lipoproteins or lipids.

The essential role of lipoproteins in the HCV life cycle led us to investigate the role of lipoprotein lipase in virus uptake and in the initiation of infection. LPL is a lipolytic enzyme (EC 3.1.1.34) that hydrolyzes lipids in TRL found in chylomicrons and VLDL (20). The hydrolysis of the triacylglycerol component of circulating TRL provides fatty acids for peripheral tissues. ApoC2 acts as a cofactor and ApoC3 as an inhibitor of the lipolytic activity of LPL (21). LPL is expressed in macrophages, muscle, and adipose tissue, but is specifically found attached to the endothelial cells lining capillaries, where it performs its lipolytic function.

Besides its catalytic function as a triglyceride hydrolase, dimeric LPL acts as a bridging factor for receptor-mediated lipoprotein uptake by the hepatocyte. This function of LPL leads to the uptake and degradation of chylomicrons and VLDL and their remnants. The lipolytic function of LPL is not required for LPL-mediated lipoprotein clearance since the enhanced uptake of lipoproteins is not affected by inhibitors of its lipolytic activity in *in vitro* and *in vivo* models (22-24). A non-catalytic function of the enzyme promotes hepatic uptake of lipoproteins via three major lipoprotein receptors: LDL-R, LRP (25) and SR-BI (26). In addition, hepatic HSPG alone can mediate the internalisation of LPL-associated ApoB containing lipoproteins independently from lipoprotein receptors (27).

In a previous study we demonstrated that dimeric LPL mediates the internalisation of lipoprotein-associated authentic HCV from patient sera into different types of cells,

including the Huh7 hepatoma cell line (28). The mechanisms of action of LPL involved the formation of a bridge between the virus-associated β-lipoproteins and cell surface HSPG. Our observations suggested that besides its function as a mediator of HCV uptake, exogenous LPL could inhibit cell infection with HCVcc. This intriguing observation led us to further analyse the effects of LPL on cell infection with two different virus strains produced in a hepatoma cell line, both *in vitro*, and *in vivo* in uPA/SCID mice engrafted with primary human hepatocytes (chimeric mice). Effectively, the Huh7.5 cell line that can be productively infected with HCV exhibits altered lipid metabolism (29, 30), whereas chimeric "humanized" mice represent the only *in vivo* HCV infection model, other than the chimpanzee, that mimics the natural infection of differentiated human primary hepatocytes with normal lipid and lipoprotein metabolism (31). Indeed, severe combined immunodeficiency disorder (SCID) mice that carry a urokinase-type plasminogen activator transgene controlled by an albumin promotor (Alb-uPA) have a hepatocyte-lethal phenotype. uPA-SCID mice can thus be transplanted with primary human hepatocytes. Repopulation occurs in a well-organized fashion and mice display human-type liver metabolism and can be infected with HCV of different genotypes (32).

Thus, in this study we investigated in *in vitro* and *in vivo* virus replication models whether LPL may act as a natural inhibitor of HCV infectivity.

Experimental procedures

Cell culture

Human Huh7.5 hepatoma cells (kindly provided by C. Rice) were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Invitrogen, Cergy Pontoise, France) supplemented with pyruvate, 10% fetal calf serum, glutamine, antibiotics, antifungal agents and 1% non-essential amino acids. Cells were maintained at 37°C under 5% CO_2.

Virus strains

The plasmid encoding the genome of the JFH-1 strain was used to generate HCVcc. The virus was cultured as described previously (33) to obtain a viral stock of approximately 10^7 IU/ml.

The pFI-J6J plasmid encoding the genome of the J6/JFH-1 virus strain was kindly provided by C. Rice. Generation of JFH-1/J6 HCV genomic RNA from purified pFI-J6J was achieved through application of the T7 Ribomax Express Large scale RNA production system (Promega). The virus was generated by transfection of Huh 7.5 cells and was cultured as previously described (34) to obtain a viral stock of approximately 7.9 10^6 IU/ml.

Cell infection with HCV in the presence and absence of LPL

Confluent monolayers of Huh 7.5 cells were grown for 48h in six-well tissue culture plates to obtain approximately 10^6 cells/well. Cells were inoculated with 25 µl of the virus preparations (containing approx. 10^6 IU) for 2h at 37°C to allow infection. Cells were washed and grown in complete DMEM for 24h or 48h at 37°C. Total RNA was then extracted, and HCV RNA levels were determined by quantitative RT-PCR. The results obtained were normalised by quantification of a cellular gene GAPDH, using the GAPDH Control Kit (Eurogentec, Angers, France). All assays were performed at least in triplicate. HCV RNA was expressed in IU relative to a HCV RNA quantification panel from Acrometrix (Berkeley, CA, USA).

To assess the effect of lipoprotein lipase on HCV infection, Huh7.5 cells were pre-incubated with 1 µg/ml of bovine LPL (Sigma) diluted in complete DMEM for 30 min at 4°C before adding the virus. To investigate the effect of LPL in the presence of a lipase inhibitor, Tetrahydrolipstatin (THL, Calbiochem, Darmstadt, Germany), Huh 7.5 cells were pre-incubated for 30 min at 4°C with 1 µg/ml of LPL diluted in complete DMEM containing 50 µg/ml THL before adding the virus.

Real-time qRT-PCR

The HCV RNA associated with cells was quantified by one-step real-time qRT-PCR using the SuperScript III Platinum One-Step qRT-PCR Kit (Invitrogen). The 5'-AGYGTTGGGTYGCGAAAG-3' and 5'-CACTCGCAAGCRCCCT-3' primers were used to amplify HCV RNA from JFH clones, and 6-FAM-CCTTGTGGTACTGCCTGA-MGB (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) was used as an internal probe. Real-time detection of the PCR products was carried out with an AbiPrism 7000. HCV RNA was quantified relative to a reference viral stock and standardized using an HCV RNA quantification panel from AcroMetrix, and values were expressed as HCV RNA IU.

Infection of chimeric uPA-SCID mice with JFH-1 and J6/JFH-1 HCVcc strains.

uPA-SCID mice transplanted with human liver were generated as described previously (35). Briefly, 10^6 cryopreserved primary human hepatocytes (BD Biosciences, Erembodegem, Belgium) were transplanted into two-week old $uPA^{+/+}$-SCID mice. Two months later, the concentration of human albumin in mouse plasma was quantified to assess the amount of human hepatocytes engrafted in the mouse liver (Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, TX, USA). Chimeric mice were infected with a virus stock prepared from cell culture supernatant that contained JFH-1 at a final concentration of 10^9 IU/ml and or J6/JFH-1 at a concentration of 7.9 10^6 IU/ml.

JFH-1 produced in mice (mJFH-1) was generated by pooling all plasma samples collected between week 1 and week 12 post-inoculation. A pool of plasma from J6/JFH-1 infected mice (mJ6/JFH-1) was generated by combining samples collected

between day 7 and day 38 post-infection. The viral titer in the mJFH-1 pool and mJ6/JFH-1 pool was 5.85 10^5 IU/ml and 7.82 10^7 IU/ml respectively, as determined by using the Roche COBAS Ampliprep – COBAS TaqMan HCV test (Roche Diagnostics, Vilvoorde, Belgium).

All studies performed on mice were approved by the Animal Ethics Committee of the Faculty of Medicine and Health Sciences, Ghent University, Belgium.

Ultracentrifugation through iodixanol gradients

Discontinuous 5-50% iodixanol density gradients (OptiPrep, Sigma) were prepared using 5 buffered solutions of iodixanol in HEPES buffered saline (Sigma). Samples were overlaid onto the gradients and centrifuged for 22h at 50000 rpm at 4°C in an SW60Ti rotor in a Beckman Coulter Optima L-90 K ultracentrifuge. Fractions (50 µl each) were collected and the density determined using a refractometer (Atago CO LTD, Tokyo, Japan).

Determination of HCV infectivity

To determine the infectivity of virus populations recovered from iodixanol gradients, Huh 7.5 cells (10^6 per well in a X-well plate) were infected with 25µl of each virus fraction and incubated for 48h at 37°C. Total RNA was extracted and HCV-RNA levels were quantified by qRT-PCR. The results were normalised taking into account the HCV-RNA content in each sample determined by qRT-PCR.

Other assays

HCV core antigen in gradient fractions was determined using the HCV Core Antigen ELISA kit (WAKO Chemicals, Ortho-Clinical Diagnostics, Germany), Apolipoprotein B was assessed using the AssayMax Human Apolipoprotein B ELISA kit (AssayPro, St. Charles, MO, USA) and cholesterol by the Amplex® Red Cholesterol Assay Kit (Invitrogen).

The levels of cholesterol in fractionated normal human serum were determined using commercial reagent kits (Roche Diagnostics (TC & TG), and ApoB concentrations were

determined using immunoturbidimetric assays (ThermoElectron reagents and calibrators).

Results

Cell infection with JFH-1 and J6/JFH-1 strains produced in Huh7.5 cells is inhibited by LPL

Preliminary experiments suggested that in spite of increasing the virus binding to the cell surface LPL inhibited cell infection by the JFH1 strain (28). Thus, we wished to verify this observation and see whether it extended to a second virus strain J6/JFH1. The genetic organisation of the two HCVcc strains, JFH-1 and J6/JFH-1, used in our studies is shown in Figure 1 A. The JFH-1 strain is based on a cloned genotype 2a HCV that was isolated from a patient with fulminant hepatitis C (33) In the chimeric J6/JFH-1 strain the genes encoding the structural, p7 and NS2 proteins derive from another virus, also of genotype 2a (HC-J6) (34).

Bovine LPL is highly homologous to human LPL (36) and is thus currently used in studies of human lipoprotein metabolism. To investigate the effect of LPL on cell infection with these two HCVcc strains, Huh 7.5 cells were preincubated with bovine LPL for 30 min at 4°C before adding the virus, according to the procedure previously described (28). As shown in Figures 1B and C, cell infection with both JFH-1 and J6/JFH-1 strains was inhibited by 90% in the presence of LPL, as evidenced by decreased levels of intracellular HCV RNA determined 24h after infection. Thus LPL, brought to Huh 7.5 cells as an exogenous ligand inhibits cell infection with two HCVcc strains.

Cell infection with HCVcc strains produced in chimeric uPA-SCID mice is inhibited by LPL

The Huh7.5 cell line exhibits several differences compared to the human primary hepatocyte, especially concerning lipoprotein metabolism (29, 30). Therefore, we investigated whether LPL would also inhibit cell infection with the same virus strains produced in primary human hepatocytes engrafted in chimeric mice. JFH-1 and J6/JFH-1 HCV strains produced in Huh7.5 cells were injected into chimeric mice.

Pooled serum samples from mice infected with JFH-1 and J6/JFH-1 (mJFH-1 and mJ6/JFH-1 respectively) were tested for their infectivity in the presence or absence of LPL. As shown in Figures 1D and E, the infection of Huh7.5 cells with both virus strains produced in mice was inhibited by approximately 90% in the presence of LPL.

These experiments provided evidence that LPL provided as an exogenous ligand has a potent inhibitory effect on cell infection with the two virus strains, produced either *in vitro* in a hepatoma cell line or *in vivo* in primary hepatocytes transplanted into chimeric mice.

Analysis of JFH-1 and J6/JFH-1 HCVcc viral strains in iodixanol gradients

To investigate whether HCVcc and mHCV have similar physico-chemical properties, and to characterize virus populations that are sensitive to LPL, we performed analyses of the virus preparations produced *in vitro* and *in vivo* in iodixanol gradients. This type of gradient is frequently used for the analysis of lipoproteins and has been applied to the separation of HCV-lipoprotein complexes in patient sera (9). To localize serum lipoproteins and their components (cholesterol, ApoB) in iodixanol gradients, a human serum sample, a supernatant from non-infected cells, and a serum sample from non-infected chimeric mice were separated in the same type of gradient (Figure 2).

The JFH1 and J6/JFH1 virus preparations used to infect of mice were subjected to isopycnic centrifugation through an iodixanol gradient. Collected fractions were analysed for the presence of HCV core antigen, HCV RNA, ApoB and cholesterol. JFH-1 strain was recovered from the gradient as two virus populations, as evidenced by the distribution of HCV core antigen (Figure 3A). The low-density virus population banded at a density range of 1.022-1.036g/ml (av. 1.03g/ml) and co-localised with the majority of ApoB and cholesterol (density range of 1.017-1.04g/ml). The major virus population was recovered with a density of 1.068-1.145g/ml (with a peak at a density of 1.086g/ml) and contained higher levels of HCV core antigen, but lower content of ApoB and cholesterol than the low-density viral population. A similar distribution of ApoB was found for the non-infected supernatant from Huh7.5 cells (Figure 2B).

Although the majority of HCV RNA was detected in the high-density virus population of JFH1, the low-density population was found to be 100 times more infectious than the higher density one (Figure 5A).

For the J6/JFH1 strain, the major virus peak banded at a density of 1.07-1.18g/ml, (Figure 4A) and the relative quantity of cholesterol detected in the gradient was significantly lower than that for JFH1 strain (Figure 4B).

Fractionation of the infected mice sera through iodixanol gradients

When mJFH-1 was fractionated through an iodixanol gradient, HCV also appeared as two virus populations. However, a "high density" population of mJFH1 was recovered at an average density of 1.053g/ml (Figure 3C). This average density for the virus produced *in vivo* was lower than that of the corresponding virus population in the original inoculum produced *in vitro* (1.053g/ml versus 1.086 g/ml). This virus population co-localised with ApoB and cholesterol (Figure 3D). The low-density virus population (which contained the majority of ApoB and cholesterol) was recovered at a similar density as for the inoculum (1.014-1.033 g/ml), but only traces of HCV core antigen could be detected in one fraction (d=1.019g/ml), probably due to the lower concentration of virus in mouse serum as compared to the inoculum. Nevertheless, when tested for relative infectivity, the low-density virus population was 1000 times more infectious than the high-density one (Figure 5B).

For J6/JFH1, the major virus population found in the mouse sera banded in iodixanol gradients with an unchanged density of 1.11-1.17g/ml (Figure 4C), and these fractions contained only very low levels of cholesterol and Apo B (Figure 4D).

Cell infection with low and high–density virus populations is inhibited by LPL

Low and high-density virus populations obtained upon fractionation of JFH-1 and mJFH-1 were tested for their infectivity in the presence and absence of LPL. These experiments evidenced that LPL inhibited cell infection with both virus populations to a

similar extent for the viruses produced either *in vitro* or *in vivo* (Figure 5, panelsC and D).

Catalytic activity of LPL is not required to induce inhibitory effect on HCV infection.

As a lipolytic enzyme, LPL displays a triacylglycerol hydrolase activity. To investigate whether the inhibition of HCV infection can be related to the lipolytic activity of LPL, we performed an additional series of experiments using tetrahydrolipstatin. THL is a specific inhibitor of the catalytic activity of LPL, which blocks the active site of the enzyme but does not influence its bridging function. These experiments showed that LPL inhibits infection with the virus produced *in vitro* (Figure 6A) and *in vivo* (Figure 6B), and that this inhibition is not abrogated by THL (Figure 6). Thus, the inhibitory effect of LPL on HCV infection is not related to its catalytic activity.

Discussion

In this study we show that LPL, a key enzyme in the lipoprotein metabolism and transport, acts as a natural inhibitor of HCV infectivity. LPL significantly inhibits infection of Huh 7.5 hepatoma cells with JFH-1 and J6/JFH-1 HCVcc strains produced in cell culture and in primary human hepatocytes engrafted into uPA-SCID mice.

HCV circulates in patient sera in association with VLDL and LDL (8, 14, 15, 17), and HCV-associated lipoproteins are an integral part of HCV particles (9). Indeed, the assembly and secretion of infectious HCV follows the VLDL assembly pathway, and drugs that block VLDL assembly (such as MTP inhibitors or siRNA targeting ApoB or ApoE) also inhibit the secretion of HCV particles (3). Only low-density, i.e. VLDL-associated, virions are secreted from infected cells, whereas high-density "immature" HCV is degraded in a proteosome independent manner (13, 37).

Lipoproteins associated with virus particles confer HCV infectivity in *in vitro* (8, 17) and *in vivo* models (16), and promote virus uptake by the LDL-R and/or SR-BI/Cla1lipoprotein receptors (6, 38). VLDL associated with HCV particles may protect the virus against neutralising antibodies (38), in agreement with clinical observations that infectious virus particles co-exist with neutralizing antibodies that are not able to control chronic HCV infection in the sera of HCV infected individuals (39, 40).

Cholesterol and sphingolipids associated with HCVcc particles are critical for virus maturation and infectivity (41). In accordance with this notion, antibodies against ApoB-containing lipoproteins efficiently inhibit infection with HCVcc (28). In addition, HCV infectivity is regulated by ApoC1 that promotes HCV-membrane fusion (42). Small interfering RNAs that target ApoB (3) or Apo E (43) efficiently inhibit the release of HCV. As all these apolipoproteins (B, E, and C1) are components of VLDL, the studies described above underlined the role of lipoproteins and their protein components in the infectivity of HCV.

Our research provides further evidence for the essential role of lipoproteins associated with virus particles in the regulation of HCV infectivity. We have previously reported that due to association of the virus with lipoproteins, exogenous LPL can mediate the uptake of authentic HCV particles from patient sera and their binding to different types of cells. Surprisingly, although LPL also increased the binding of HCVcc to Huh 7.5cells, it had a potent inhibitory effect on cell infection (28). However, it remained unclear whether LPL could also inhibit cell infection by the virus produced in primary human hepatocytes.

In this study, we show that the levels of infection with two HCV strains, JFH-1 and J6/JFH-1, produced either *in vitro* in cell culture or *in vivo* in primary human hepatocytes engrafted into chimeric uPA-SCID mice, decreased by 90% in the presence of exogenous LPL. The ultracentrifugation of virus samples through iodixanol gradients revealed that JFH-1 and J6/JFH-1banded at a density range of 1.02-1.018g/ml in accordance with a data recently published for other HCVcc strains (44) and could be separated into 2 populations as evidenced by the detection of HCV core in different fractions of the gradient. Low-density species of the virus banded at an average density of 1.03g/ml, whereas a second and major population banded at an average density of 1.086g/ml. Nevertheless, both virus-containing fractions co-localised with ApoB and cholesterol, and their densities indicated their association with lipoproteins. These densities were similar to those reported by Nielsen et al (9) for the natural virus from human sera, even if the proportions of virus populations widely varied from patient to patient.

The second, major virus peak detected in fractionated serum from mice inoculated with JFH1, and thus produced in primary hepatocytes, had a significantly lower density than the corresponding peak obtained with the same virus produced *in vitro* (1.053g/ml versus 1.086g/ml). Similar distribution of apoB and cholesterol were found for non-infected cell supernatants versus non-infected sera from chimeric mice. These observations suggest that the density of the virus population might be related to the

composition of lipoproteins secreted from the virus-producing cells. However, the second peak of mJ6/JFH1 was recovered at an unchanged density compared to the original inoculum (1.07-1.18g/ml versus 1.08-1.18g/ml). Since the J6/JFH1 strain differs from JFH1 in its structural proteins (even if both strains are of 2a genotype), the differences in the amino acid sequences of the envelope proteins could account for their interaction with lipoproteins (45), and thus influence overall physicochemical properties of HCVcc, including the density of the virus particles.

The low-density virus populations remarked in our study were considerably more infectious than the higher density virus populations (100 times for JFH1 and 1000 times for mJFH1). Interestingly, even if the low-density peak of the virus was barely detectable by HCV assays; these fractions, containing the major portion of ApoB and cholesterol, were highly infectious. Low-density virus populations from patient sera had also the highest infectivity when inoculated into chimpanzees or used to infect different types of cells *in vitro* (16-18). HCVcc produced previously in chimeric mice infected with cell-derived viruses showed lower density and highest specific activity than the same viruses produced in cell culture *in vitro* (18). However, in our study we used modified iodixanol gradients, which permitted us to visualise the HCVcc populations with even lower density than those previously isolated using sucrose gradients (18). This "very" low-density (average 1.02g/ml) species of both HCVcc and mHCVcc showed the highest infectivity, of all HCVcc populations recorded to date, confirming a crucial role of virus-associated lipoproteins for the initiation of infection and, as recently reported (44) for membrane fusion.

The morphology of virions of different densities remains unknown. However in our study both low and higher density virus populations co-localised with ApoB and cholesterol, even if these compounds were present in different amounts in the distinct virus-containing fractions. Notably, LPL inhibited cell infection with both low and high density virus populations to a similar extent, suggesting that the lipid composition of the virus populations did not significantly influence the effect of the enzyme on HCV

infectivity. Indeed, LPL enhances uptake and degradation of different ApoB-containing lipoproteins such as LDL, VLDL, chylomicrons and their remnants (22).

LPL plays a central role in lipid/lipoprotein metabolism and has essentially two biological functions (20, 46). Firstly, LPL hydrolyses triglycerides in TG-rich lipoproteins such as chylomicrons and VLDL, providing free fatty acids for peripheral tissues, especially adipose tissue, skeletal and cardiac muscle. Released fatty acids are internalised by cells via surface receptors, such as CD36, that facilitate their uptake and storage (17, 33, (20). The lipolysis is activated by apoC2, whereas apoC3 acts as an inhibitor of this process (20). The enzyme is synthesised in adipose or muscle tissues and is mainly transported to the luminal surface of the capillary vesicular endothelium where it binds TRL and hydrolyses their TG content. LPL is only functional in a dimeric form; LPL dimers are tethered to HSPG or GPIHBP1 at the endothelial cell surface, recently reported as a key platform for LPL-mediated lipolysis of TRL on the microvascular endothelium (47).

In addition to the hydrolysis of ApoB lipoproteins and chylomicrons, LPL targets TRL to the liver and mediates their clearance from the circulation by facilitating receptor-mediated uptake (20, 22). After lipolysis, the lipoproteins that have been reduced in size and enriched with apoE (VLDL remnants) are taken up by the liver via HSPG and LDL-R or LRP, or by SR-BI in the absence of these classical apoE-recognizing receptors(26).

Notably, hepatocyte HSPG chains that bind the enzyme exhibit much stronger ligand affinity than does HSPG in other tissues, including the peripheral endothelium (48). This explains why the injection of exogenous LPL results in rapid hepatic clearance of lipoproteins (22); dimeric LPL enhances hepatic uptake of chylomicrons and VLDL by a mechanism that involves bridging between lipoproteins and cell surface HSPG that mediates a "high speed" pathway.

Since LPL has two biological functions, the effect of LPL on HCV infection could be related either to its enzymatic activity (and induction changes in the composition of

virus-associated lipoproteins) or to the LPL bridging activity, mediating hepatic uptake of lipoproteins. It has been reported that LPL from *Pseudomonas aeruginosa* showed a virolytic activity towards natural HCV from patient sera (49). In a previous study (28) we confirmed that indeed, the treatment of HCVcc with *Pseudomonas*-derived LPL significantly decreased the levels of HCV RNA in virus preparations, suggesting a direct lipolytic effect on the virus. However, such an effect was not observed when bovine LPL, homologous to the human LPL (28). Also, in the current study we excluded the possibility that LPL degrades virus particles: treatment of the virus with soluble LPL, at the same concentration and for the same period of time as for our cellular approaches, did not induce significant changes either in the density or in the HCV RNA content of the virus fractions of iodixanol gradients (data not shown). Most importantly, we demonstrated that the inhibitory effect of LPL on infectivity of HCV produced *in vivo* and *in vitro* was not abrogated by THL, a specific lipase inhibitor.

In a previous study we demonstrated that the mechanism of action of LPL on natural HCV from patient sera was analogical to the hepatic uptake of circulating lipoproteins from the bloodstream. We showed that: (i) LPL binds to virus-associated lipoproteins (its action was inhibited by anti-beta-lipoprotein antibodies) and (ii) to HSPG at the cell surface, (iii); only dimeric LPL was able to interact with the virus (as evidenced by specific ELISA assays capable of differentiating between dimeric and monomeric forms of LPL) and (iiii) this action induced internalisation of the virus into the cell, analogically to the cellular uptake of lipoproteins by the bridging function of LPL (28).

Since LPL mediates the cellular uptake of ApoB-lipoprotein-associated serum-derived HCV (28), and inhibits HCVcc infection, it is conceivable that LPL could mediate virus uptake by an alternative pathway, different from the productive virus cell entry mediated by CD-81 SR-BI and tight junction molecules. In such a process, not related to the catalytic activity of LPL, the internalisation process via LPL would involve classical apoE recognising LDL receptors (LDL-R or LRP) (20), or alternatively, HSPG and SR-BI (26). Following such a process, internalised remnants fuse with lysosomes,

activating proteolysis and lipolysis, which produce free cholesterol that can be integrated into the newly synthesised VLDL or secreted in bile. Analogically, LPL-mediated HCV uptake could follow the lipoprotein degradation pathway leading to abortive infection. We are currently investigating this hypothesis.

Our study suggests that the lipoprotein component associated with the virus particles could be a new target for anti-viral strategies. The anti-viral properties of LPL could be assessed in a chimeric mouse model, to determine whether the injection of LPL before or during infection could protect against infection or decreased viremia, respectively, in infected mice. Indeed, increased LPL expression can be achieved using adenovirus-based vectors (50) and this strategy has been proposed as a treatment for LPL deficiency.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge C. Rice for providing J6/JFH1 HCVcc strain and mice sera infected with J6/JFH1. We thank Katherine Kean for critical review of the manuscript.

Figure legends

Figure 1

LPL inhibits cell infection by HCV JFH-1 and J6/JFH-1 strains produced *in vitro* and *in vivo* in a chimeric mouse model.

A. Schematic representation of the genomic organisation of the JFH-1 and J6/JFH-1 strains. Light grey corresponds to the JFH-1 genome and dark grey to the HC-J6 genome, both of which are genotype 2a.

LPL inhibits infection of Huh 7.5 cells with JFH-1 (B) and J6/JFH-1 (C) HCVcc strains produced in a Huh 7.5 hepatoma cell line. Cells were incubated with LPL for 30 min at 4°C and then with samples that contained virus for 2h at 37°C to infect cells. HCV RNA was extracted from cells 24h post infection and was quantified by qRT-PCR. The results obtained were normalized by the determination of RNA of a cellular gene (GADPH) and were expressed as a percent of the control obtained in the absence of LPL.

LPL inhibits HCV infection of Huh 7.5 cells with JFH-1 (D) and J6/JFH-1 (E) strains produced in chimeric uPA-SCID mice with transplanted human hepatocytes (mJFH-1 and mJ6/JFH-1, respectively). JFH-1 and J6/JFH-1 viruses produced in Huh 7.5 cells were used to infect human hepatocytes transplanted into chimeric uPA mice. Serum samples collected from infected mice were pooled and tested for their capacity to infect Huh7.5 cells in the presence and absence of LPL, as outlined above.

Figure 2

Distribution of ApoB and cholesterol in non-infected controls centrifuged through iodixanol gradients.

A sample (120 μl) of normal human serum was subjected to isopycnic centrifugation through a discontinous iodixanol gradient. Centrifugation was carried out for 22h at 50000rpm in a SW-60ti rotor. The distribution of cholesterol (A) and ApoB (B) was

determined as described in the Experimental procedures section.

(C) Distribution of ApoB in the supernatant from non-infected Huh 7.5 cells. The supernatant was prepared as described for the infected cell supernatant and subjected to centrifugation through an iodixanol gradient. (D) Distribution of ApoB in the sera of non-infected chimeric mice separated through an iodixanol gradient. The presence of ApoB (for C and D) was determined using a commercial ELISA assay.

Figure 3

Iodixanol gradient analysis of the JFH-1 strain.

The JFH-1 strain produced in Huh 7.5 cells (A and B) and in the chimeric mouse model (mJFH-1, C and D) was subjected to isopycnic centrifugation through iodixanol gradients. HCV core antigen was quantified by ELISA and HCV RNA by qRT-PCR (A and C); ApoB and cholesterol were determined by ELISA (B and D).

Figure 4.

Iodixanol gradient analysis of the J6/JFH-1 strain.

J6/JFH-1 strain produced in Huh 7.5 cells (A and B) and in the chimeric mouse model (mJ6/JFH-1, C and D) was subjected to isopycnic centrifugation through iodixanol gradients. HCV core antigen was quantified by ELISA and HCV-RNA by qRT-PCR (A and C); ApoB and cholesterol by ELISA (B and D).

Figure 5

Cell infection with both low and high density virus populations from iodixanol gradients is inhibited by LPL.

Samples of the low and high density virus populations obtained after centrifugation through iodixanol gradients of JFH1 grown in cell culture (A) and m-JFH1 from the chimeric mouse model (B) (both gradients are shown in Figure 3) were tested for their relative infectivity as described in the experimental procedures section.

Samples of the same virus populations produced in the cell culture (C) and in

chimeric mice (D) were used to infect Huh 7.5 cells in the presence and absence of LPL. Results are presented as a % of HCV RNA detected 24h post-infection in cells infected in the presence of LPL in comparison with RNA levels in cells infected in the absence of LPL (considered as 100%).

Figure 6

Inhibitory effect of LPL on HCVcc infection is not related to its catalytic activity.

To assess whether the inhibitory effect of LPL on HCV infection depends on its enzymatic activity, Huh7.5 cells were pre-incubated with 1 µg/ml of LPL in the presence or absence of 50 µg/ml of THL before adding the virus. LPL inhibits infection with JFH1 produced in Huh 7.5 cells (A) and in chimeric mice (mJFH-1) (B) and in both cases the inhibitory effect of LPL is not abrogated by THL.

References

1. Shepard CW, Finelli L, Alter MJ. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. Lancet Infect Dis 2005;5:558-567.

2. Pawlotsky JM. Therapy of hepatitis C: from empiricism to eradication. Hepatology 2006;43:S207-220.

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

4. Kapadia SB, Chisari FV. Hepatitis C virus RNA replication is regulated by host geranylgeranylation and fatty acids. Proc Natl Acad Sci U S A 2005;102:2561-2566.

5. Ye J. Reliance of host cholesterol metabolic pathways for the life cycle of hepatitis C virus. PLoS Pathog 2007;3:e108.

6. Andre P, Perlemuter G, Budkowska A, Brechot C, Lotteau V. Hepatitis C virus particles and lipoprotein metabolism. Seminars in Liver Disease 2005;25:93-104.

7. Petit JM, Benichou M, Duvillard L, Jooste V, Bour JB, Minello A, Verges B, et al. Hepatitis C virus-associated hypobetalipoproteinemia is correlated with plasma viral load, steatosis, and liver fibrosis. Am J Gastroenterology 2003;98:1150-1154.

8. Andre P, Komurian-Pradel F, Deforges S, Perret M, Berland JL, Sodoyer M, Pol S, et al. Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles. J Virol 2002;76:6919-6928.

9. Nielsen SU, Bassendine MF, Burt AD, Martin C, Pumeechockchai W, Toms GL. Association between hepatitis C virus and very-low-density lipoprotein (VLDL)/LDL analyzed in iodixanol density gradients. J Virol 2006;80:2418-2428.

10. Petit MA, Lievre M, Peyrol S, De Sequeira S, Berthillon P, Ruigrok RW, Trepo C. Enveloped particles in the serum of chronic hepatitis C patients. Virology 2005;336:144-153.

11. Maillard P, Krawczynski K, Nitkiewicz J, Bronnert C, Sidorkiewicz M, Gounon P, Dubuisson J, et al. Nonenveloped nucleocapsids of hepatitis C virus in the serum of infected patients. Journal of Virology 2001;75:8240-8250.

12. Masciopinto F, Giovani C, Campagnoli S, Galli-Stampino L, Colombatto P, Brunetto M, Yen TS, et al. Association of hepatitis C virus envelope proteins with exosomes. Eur J Immunol 2004;34:2834-2842.

13. Gastaminza P, Cheng G, Wieland S, Zhong J, Liao W, Chisari FV. Cellular determinants of hepatitis C virus assembly, maturation, degradation, and secretion. J Virol 2008;82:2120-2129.

14. Thomssen R, Bonk S, Propfe C, Heermann KH, Kochel HG, Uy A. Association of hepatitis C virus in human sera with beta-lipoprotein. Medical Microbiology & Immunology 1992;181:293-300.

15. Prince AM, Huima-Byron T, Parker TS, Levine DM. Visualization of hepatitis C virions and putative defective interfering particles isolated from low-density lipoproteins. Journal of Viral Hepatitis 1996;3:11-17.

16. Bradley DW, Maynard JE, Popper H, Ebert JW, Cook EH, Fields HA, Kemler BJ. Persistent non-A, non-B hepatitis in experimentally infected chimpanzees. Journal of Infectious Diseases 1981;143:210-218.

17. Agnello V, Abel G, Elfahal M, Knight GB, Zhang QX. Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1999;96:12766-12771.

18. Lindenbach BD, Meuleman P, Ploss A, Vanwolleghem T, Syder AJ, McKeating JA, Lanford RE, et al. Cell culture-grown hepatitis C virus is infectious in vivo and can be recultured in vitro. Proc Natl Acad Sci U S A 2006;103:3805-3809.

19. Burlone ME, Budkowska A. Hepatitis C virus cell entry: role of lipoproteins and cellular receptors. J Gen Virol 2009;90:1055-1070.

20. Mead JR, Irvine SA, Ramji DP. Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease. J Mol Med 2002;80:753-769.

21. Jong MC, Hofker MH, Havekes LM. Role of ApoCs in lipoprotein metabolism: functional differences between ApoC1, ApoC2, and ApoC3. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1999;19:472-484.

22. Zheng C, Murdoch SJ, Brunzell JD, Sacks FM. Lipoprotein lipase bound to apolipoprotein B lipoproteins accelerates clearance of postprandial lipoproteins in humans. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2006;26:891-896.

23. Beisiegel U, Weber W, Bengtsson-Olivecrona G. Lipoprotein lipase enhances the binding of chylomicrons to low density lipoprotein receptor-related protein. Proc Natl Acad Sci U S A 1991;88:8342-8346.

24. Merkel M, Kako Y, Radner H, Cho IS, Ramasamy R, Brunzell JD, Goldberg IJ, et al. Catalytically inactive lipoprotein lipase expression in muscle of transgenic mice increases very low density lipoprotein uptake: direct evidence that lipoprotein lipase bridging occurs in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A 1998;95:13841-13846.

25. Cooper AD. Hepatic uptake of chylomicron remnants. J Lipid Res 1997;38:2173-2192.

26. Hu L, van der Hoogt CC, Espirito Santo SM, Out R, Kypreos KE, van Vlijmen BJ, Van Berkel TJ, et al. The hepatic uptake of VLDL in lrp-ldlr-/-vldlr-/- mice is regulated by LPL activity and involves proteoglycans and SR-BI. J Lipid Res 2008;49:1553-1561.

27. Berryman DE, Bensadoun A. Heparan sulfate proteoglycans are primarily responsible for the maintenance of enzyme activity, binding, and degradation of lipoprotein lipase in Chinese hamster ovary cells. J Biol Chem 1995;270:24525-24531.

28. Andreo U, Maillard P, Kalinina O, Walic M, Meurs E, Martinot M, Marcellin P, et al. Lipoprotein lipase mediates hepatitis C virus (HCV) cell entry and inhibits HCV infection. Cell Microbiol 2007;9:2445-2456.

29. Bukh J, Purcell RH. A milestone for hepatitis C virus research: A virus generated in cell culture is fully viable in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A 2006;103:3500-3501.

30. Icard V, Diaz O, Scholtes C, Perrin-Cocon L, Ramiere C, Bartenschlager R, Penin F, et al. Secretion of hepatitis C virus envelope glycoproteins depends on assembly of apolipoprotein B positive lipoproteins. PLoS One 2009;4:e4233.

31. Meuleman P, Libbrecht L, De Vos R, de Hemptinne B, Gevaert K, Vandekerckhove J, Roskams T, et al. Morphological and biochemical characterization of a human liver in a uPA-SCID mouse chimera. Hepatology 2005;41:847-856.

32. Meuleman P, Leroux-Roels G. The human liver-uPA-SCID mouse: a model for the evaluation of antiviral compounds against HBV and HCV. Antiviral Res 2008;80:231-238.

33. Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, Murthy K, et al. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. Nat Med 2005;11:791-796.

34. Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, Wolk B, Tellinghuisen TL, Liu CC, Maruyama T, et al. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. Science 2005;309:623-626.

35. Meuleman P, Vanlandschoot P, Leroux-Roels G. A simple and rapid method to determine the zygosity of uPA-transgenic SCID mice. Biochem Biophys Res Commun 2003;308:375-378.

36. Raisonnier A, Etienne J, Arnault F, Brault D, Noe L, Chuat JC, Galibert F. Comparison of the cDNA and amino acid sequences of lipoprotein lipase in eight species. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 1995;111:385-398.

37. Gastaminza P, Kapadia SB, Chisari FV. Differential biophysical properties of infectious intracellular and secreted hepatitis C virus particles. J Virol 2006;80:11074-11081.

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

39. von Hahn T, Yoon JC, Alter H, Rice CM, Rehermann B, Balfe P, McKeating JA. Hepatitis C virus continuously escapes from neutralizing antibody and T-cell responses during chronic infection in vivo. Gastroenterology 2007;132:667-678.

40. Haberstroh A, Schnober EK, Zeisel MB, Carolla P, Barth H, Blum HE, Cosset FL, et al. Neutralizing host responses in hepatitis C virus infection target viral entry at postbinding steps and membrane fusion. Gastroenterology 2008;135:1719-1728 e1711.

41. Aizaki H, Morikawa K, Fukasawa M, Hara H, Inoue Y, Tani H, Saito K, et al. Critical role of virion-associated cholesterol and sphingolipid in hepatitis C virus infection. J Virol 2008;82:5715-5724.

42. Dreux M, Boson B, Ricard-Blum S, Molle J, Lavillette D, Bartosch B, Pecheur EI, et al. The exchangeable apolipoprotein ApoC-I promotes membrane fusion of hepatitis C virus. J Biol Chem 2007;282:32357-32369.

43. Chang KS, Jiang J, Cai Z, Luo G. Human apolipoprotein e is required for infectivity and production of hepatitis C virus in cell culture. J Virol 2007;81:13783-13793.

44. Haid S, Pietschmann T, Pecheur EI. Low pH-dependent hepatitis C virus membrane fusion depends on E2 integrity, target lipid composition, and density of virus particles. J Biol Chem 2009;284:17657-17667.

45. Tao W, Xu C, Ding Q, Li R, Xiang Y, Chung J, Zhong J. A single point mutation in E2 enhances hepatitis C virus infectivity and alters lipoprotein association of viral particles. Virology 2009;395:67-76.

46. Casaroli-Marano RP, Garcia R, Vilella E, Olivecrona G, Reina M, Vilaro S. Binding and intracellular trafficking of lipoprotein lipase and triacylglycerol-rich lipoproteins by liver cells. J Lipid Res 1998;39:789-806.

47. Beigneux AP, Davies BS, Bensadoun A, Fong LG, Young SG. GPIHBP1, a GPI-anchored protein required for the lipolytic processing of triglyceride-rich lipoproteins. J Lipid Res 2009;50 Suppl:S57-62.

48. Williams KJ. Molecular processes that handle -- and mishandle -- dietary lipids. J Clin Invest 2008;118:3247-3259.

49. Thomssen R, Bonk S. Virolytic action of lipoprotein lipase on hepatitis C virus in human sera. Med Microbiol Immunol 2002;191:17-24.

50. Stroes ES, Nierman MC, Meulenberg JJ, Franssen R, Twisk J, Henny CP, Maas MM, et al. Intramuscular administration of AAV1-lipoprotein lipase S447X lowers triglycerides in lipoprotein lipase-deficient patients. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2008;28:2303-2304.

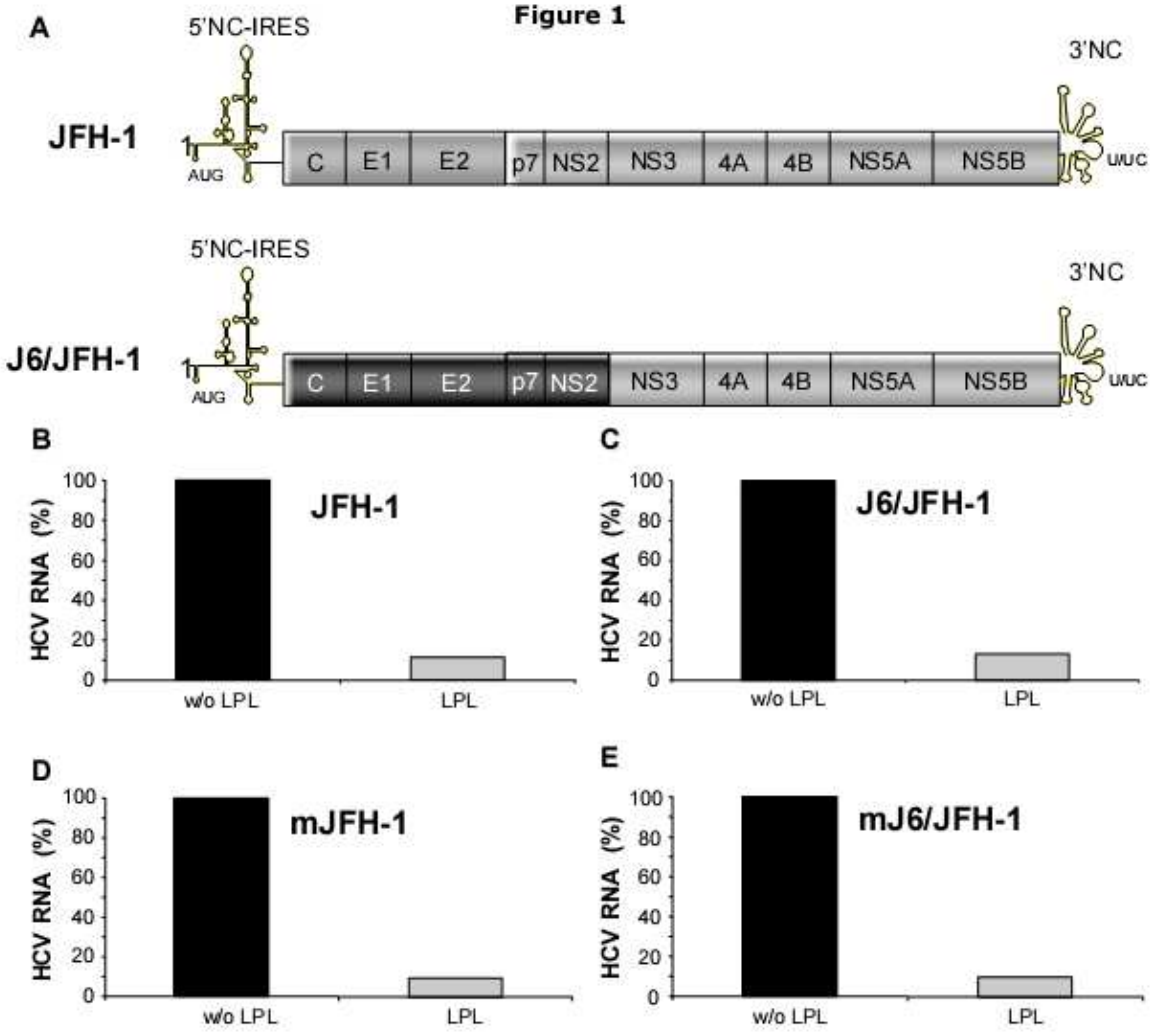


Figure 1
A
5'NC-IRES
3'NC
JFH-1
AUG
C
E1
E2
p7
NS2
NS3
4A
4B
NS5A
NS5B
UUC
5'NC-IRES
3'NC
J6/JFH-1
AUG
C
E1
E2
p7
NS2
NS3
4A
4B
NS5A
NS5B
UUC
B
JFH-1
HCV RNA (%)
100
80
60
40
20
0
w/o LPL
LPL
C
J6/JFH-1
HCV RNA (%)
100
80
60
40
20
0
w/o LPL
LPL
D
mJFH-1
HCV RNA (%)
100
80
60
40
20
0
w/o LPL
LPL
E
mJ6/JFH-1
HCV RNA (%)
100
80
60
40
20
0
w/o LPL
LPL

Figure 2

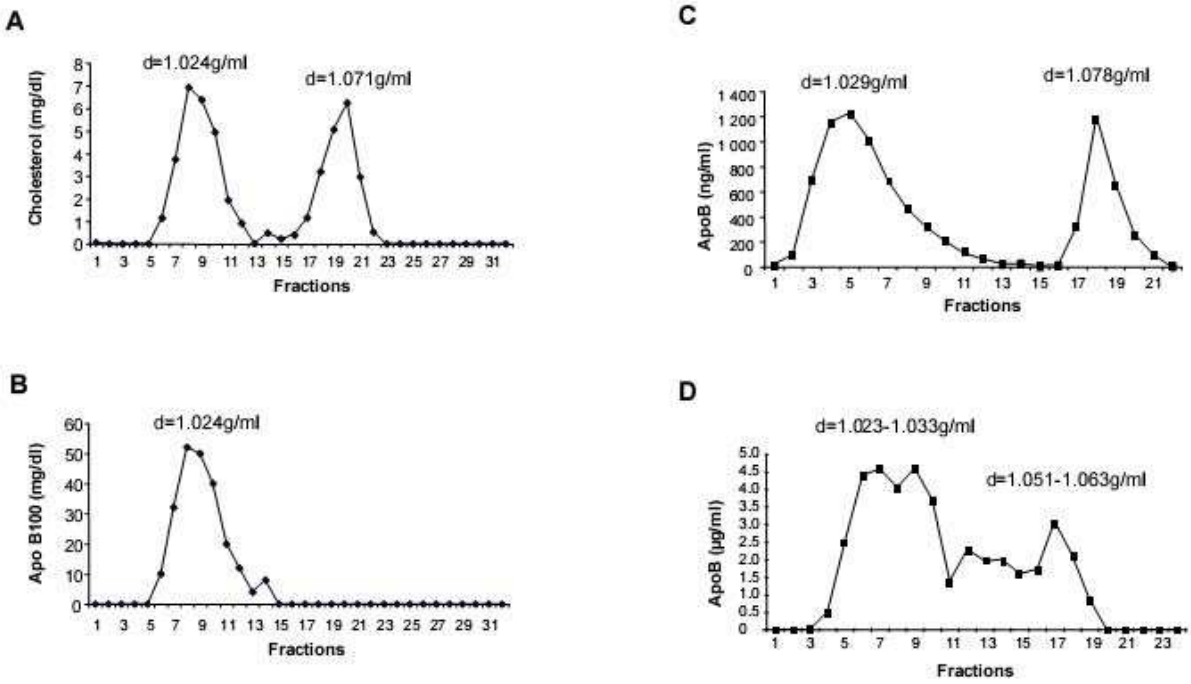

A
d=1.024g/ml
d=1.071g/ml
Cholesterol (mg/dl)
Fractions
B
d=1.024g/ml
Apo B100 (mg/dl)
Fractions
C
d=1.029g/ml
d=1.078g/ml
ApoB (ng/ml)
Fractions
D
d=1.023-1.033g/ml
d=1.051-1.063g/ml
ApoB (µg/ml)
Fractions

Figure 3

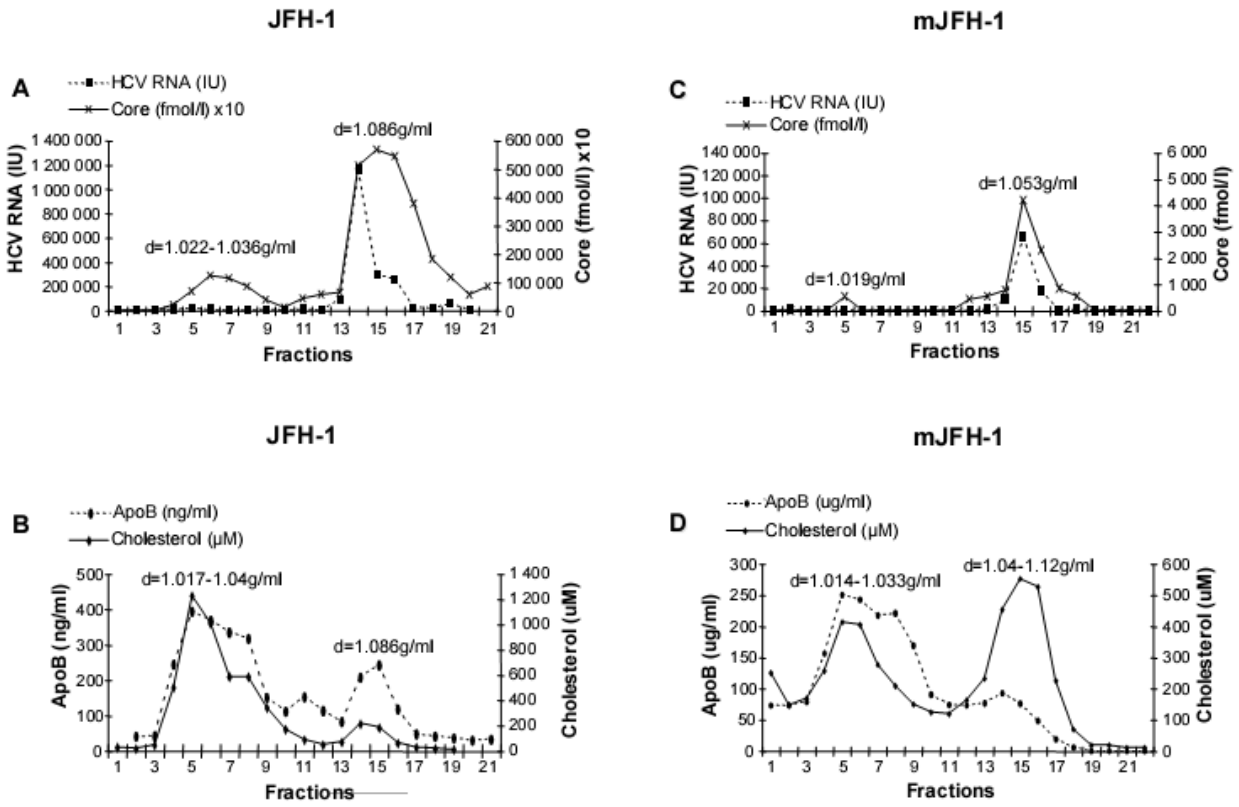

JFH-1
mJFH-1
A
HCV RNA (IU)
Core (fmol/l) x10
d=1.086g/ml
d=1.022-1.036g/ml
HCV RNA (IU)
Core (fmol/l) x10
Fractions
C
HCV RNA (IU)
Core (fmol/l)
d=1.053g/ml
d=1.019g/ml
HCV RNA (IU)
Core (fmol/l)
Fractions
JFH-1
mJFH-1
B
ApoB (ng/ml)
Cholesterol (µM)
d=1.017-1.04g/ml
d=1.086g/ml
ApoB (ng/ml)
Cholesterol (uM)
Fractions
D
ApoB (ug/ml)
Cholesterol (µM)
d=1.014-1.033g/ml
d=1.04-1.12g/ml
ApoB (ug/ml)
Cholesterol (uM)
Fractions

Figure 4

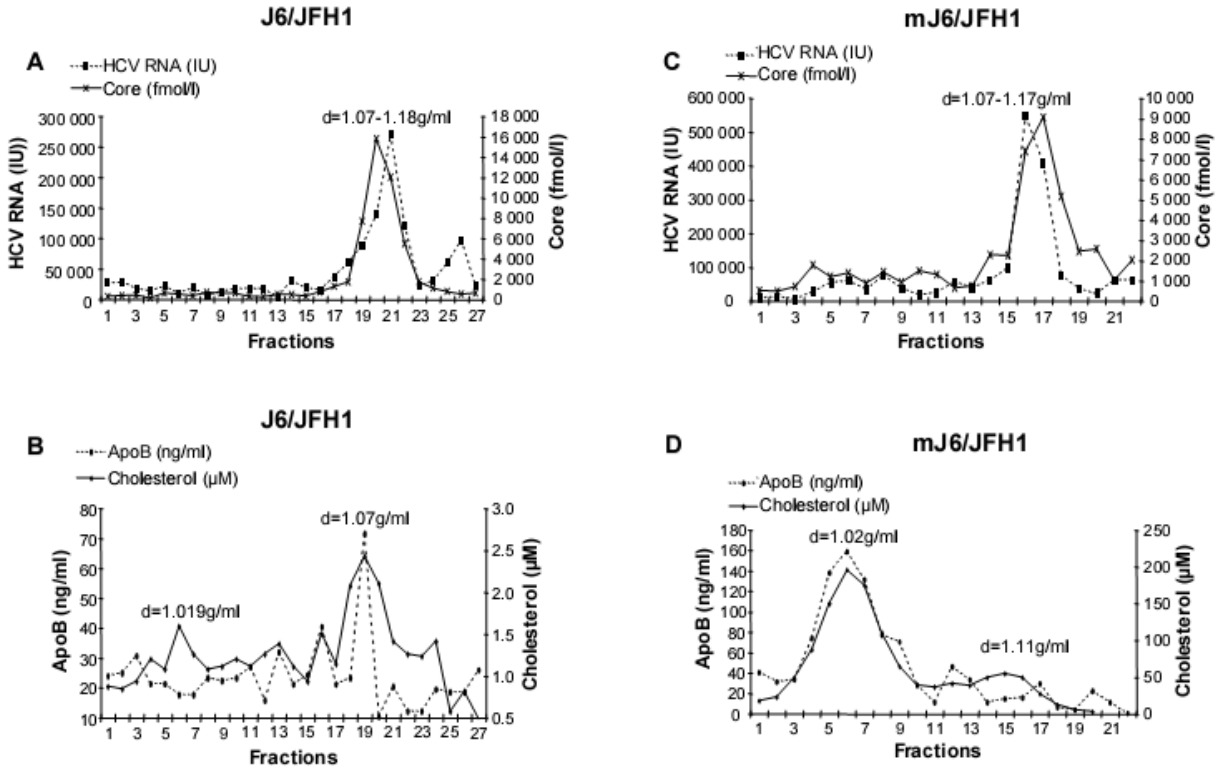

J6/JFH1
A
HCV RNA (IU)
Core (fmol/l)
d=1.07-1.18g/ml
HCV RNA (IU))
Core (fmol/l)
Fractions
mJ6/JFH1
C
HCV RNA (IU)
Core (fmol/l)
d=1.07-1.17g/ml
HCV RNA (IU)
Core (fmol/l)
Fractions
J6/JFH1
B
ApoB (ng/ml)
Cholesterol (µM)
d=1.07g/ml
d=1.019g/ml
ApoB (ng/ml)
Cholesterol (µM)
Fractions
mJ6/JFH1
D
ApoB (ng/ml)
Cholesterol (µM)
d=1.02g/ml
d=1.11g/ml
ApoB (ng/ml)
Cholesterol (µM)
Fractions

Figure 5

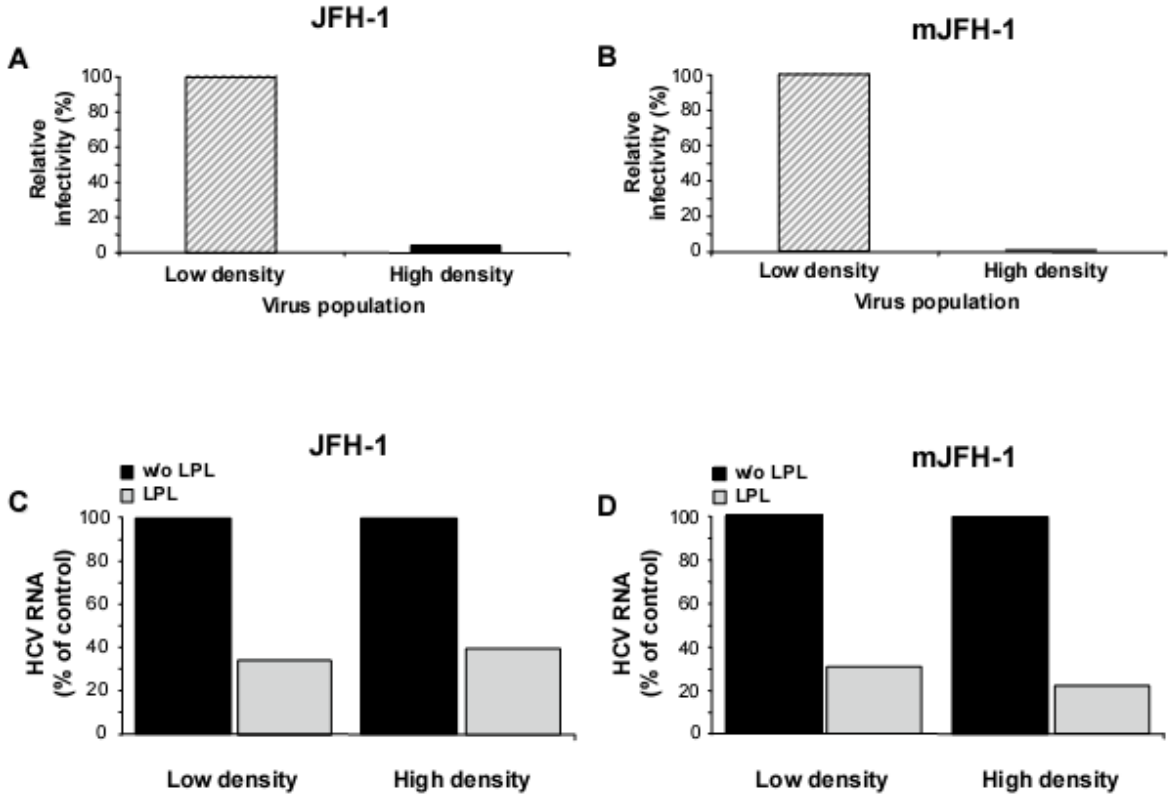
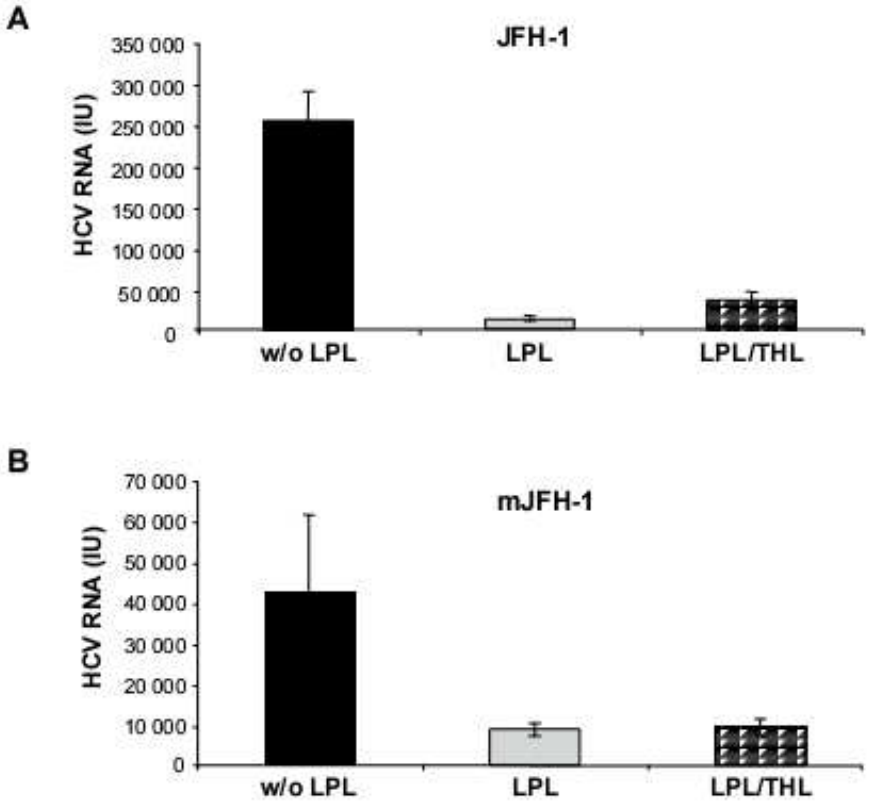

A
JFH-1
Relative infectivity (%)
100
80
60
40
20
0
Low density
High density
Virus population
B
mJFH-1
Relative infectivity (%)
100
80
60
40
20
0
Low density
High density
Virus population
C
JFH-1
wo LPL
LPL
HCV RNA (% of control)
100
80
60
40
20
0
Low density
High density
D
mJFH-1
wo LPL
LPL
HCV RNA (% of control)
100
80
60
40
20
0
Low density
High density

Figure 6


A
JFH-1
HCV RNA (IU)
350 000
300 000
250 000
200 000
150 000
100 000
50 000
0
w/o LPL
LPL
LPL/THL
B
mJFH-1
HCV RNA (IU)
70 000
60 000
50 000
40 000
30 000
20 000
10 000
0
w/o LPL
LPL
LPL/THL

PARTIE II : ROLE DU RESEAU DE MICROTUBULES DANS L'ENTREE DU VHC ET LES ETAPES PRECOCES DE L'INFECTION

ROLE DU RESEAU DE MICROTUBULES DANS L'ENTREE DU VHC ET LES ETAPES PRECOCES DE L'INFECTION

Après traduction de la polyprotéine virale, la protéine de capside est dirigée vers le RE par une séquence peptide signal située entre la protéine de capside et la glycoprotéine d'enveloppe E1. La protéine de capside du VHC est une phosphoprotéine basique. Sa maturation requiert l'intervention de deux protéases cellulaires. Une signal peptidase clive tout d'abord au niveau de la jonction peptide signal/E1, libérant la partie Nt de E1 et donnant la forme immature de la protéine de capside. Sa forme mature est générée après clivage du peptide signal situé en Ct par une signal peptide peptidase du RE. La protéine de capside est libérée de la membrane du RE et va aller se lier aux LD. Elle est constituée d'un domaine D1 hydrophile qui comprend les aa 1 à 120, impliqué dans la liaison à l'ARN et l'homo-oligomérisation, d'un domaine D2 qui se termine par l'aa 179 et cible la protéine aux LD et sous sa forme immature d'un domaine III (ancrage, peptide signal). Les résidus 112 à 152 permettent son association aux membranes du RE ou des mitochondries (McLauchlan 2009).
La protéine de capside est à la fois un constituant structural du virus et un facteur pathogénique. Elle interagit avec de multiples protéines cellulaires, conduisant à d'importantes altérations de la signalisation de la cellule hôte : affecte le métabolisme lipidique tel qu'en atteste la présence de stéatose, entraine une résistance à l'insuline et le développement de HCC (Mori et al. 2008). Cet effet peut être dû à son association aux LD entrainant leur accumulation dans le cytoplasme. L'interaction de la protéine de capside avec les LD a été prouvée dans le modèle de culture cellulaire HCVcc. Cette association pourrait jouer un rôle de « plateforme » concentrant les éléments viraux et cellulaires essentiels à l'assemblage des particules virales infectieuses (Miyanari et al. 2007; McLauchlan 2009).

Les microtubules sont des constituants dynamiques essentiels du cytosquelette. Ce sont des polymères polarisés composés d'hétérodimères de tubuline α/β. Ils alternent des phases de polymérisation et dépolymérisation dépendantes du phénomène d'instabilité dynamique. Le transport actif par les microtubules est bidirectionnel et implique la présence de protéines moteurs dirigées vers les extrémités positive ou négative : la kinésine et la dynéine. Un autre phénomène du transport cytosolique faisant intervenir les microtubules, nommé « treadmilling », implique une polymérisation à l'extrémité positive et une dépolymérisation

à l'extrémité négative, après coupure des microtubules par la katénine cellulaire (Figure 27).

Les microtubules ont d'importantes fonctions dans le cycle viral de nombreux virus. Le transport cytoplasmique sur les microtubules donne en effet les moyens aux virus d'atteindre les sites de réplication ou leur permet, une fois assemblés, d'être libérés de la cellule. De plus, l'intégrité des microtubules est essentielle à la morphogénèse virale et à la sécrétion des particules virales par les cellules infectées (Dohner et al. 2005). Des techniques de vidéomicroscopie ont ainsi permis l'observation de mouvements des virus sur les microtubules (Greber 2006). De nombreuses interactions ont également été observées entre les protéines virales de divers virus tels que HSV1, CMV, HIV-1, rage, adénovirus, parvovirus, SV40, influenza, VHB, vaccine et les protéines associées aux microtubules (Dohner et al. 2005). Durant l'infection, certains virus sont transportés sur les microtubules à l'intérieur de vésicules membranaires alors que d'autres utilisent la machinerie des microtubules pour leur transport *via* l'interaction de protéines virales avec les protéines moteurs ou d'autres protéines associées aux microtubules.

Des études antérieures ont démontré que le cytosquelette est impliqué dans la réplication du VHC du fait que la formation des complexes de réplication du virus soit étroitement liée à l'organisation dynamique du RE, des filaments d'actine et du réseau de microtubules (Lai et al. 2008; Wolk et al. 2008). L'équipe de McLauchlan a proposé un modèle décrivant le rôle putatif de l'association protéine de capside/LD dans le cycle viral du VHC : la perte de l'ADRP induit un déséquilibre entre les protéines motrices, ce qui conduit au déplacement des LD vers la périphérie nucléaire, près du MTOC. En présence d'ADRP, les LD peuvent interagir avec les microtubules par l'intermédiaire des protéines motrices (dynéine). Il en résulte une distribution uniforme des LD. Lorsque la protéine de capside se lie aux LD, l'ADRP se dissocie de la surface des LD. La redistribution des LD autour du MTOC résulte en une forte promiscuité de la protéine de capside avec le lieu de réplication de l'ARN viral, au niveau des invaginations de la membrane du RE ou « membranous web » (complexes de réplication). Cette promiscuité facilite le transfert de la protéine de capside au RE et son interaction avec l'ARN viral, pour former la nucléocapside (Boulant et al. 2008). En outre, le rôle essentiel des LD et par conséquent des microtubules dans la production de particules virales infectieuses est lié à l'agrégation de complexe de réplication au niveau de ces LD et du « membranous web » (Miyanari et al. 2003; Boulant et al. 2008; Roingeard 2008; Ogawa et al. 2009).

Le VHC induit un rapprochement des membranes de LD et du « membranous web ». La protéine de capside associée aux LD recrute les protéines non-structurales au niveau du complexe de réplication, de façon à synthétiser le virus (Miyanari et al. 2007). De plus, les glycoprotéines d'enveloppe y sont localisées. L'assemblage du virion peut alors débuter. Ce dernier utilise ensuite le réseau de microtubules pour aboutir à sa sécrétion. Le rôle exact des microtubules dans l'entrée du VHC dans la cellule et dans l'initiation d'une infection productive n'a pas encore été abordé. Nous avons donc investigué ce sujet sur le système d'infection en culture cellulaire HCVcc.

Nous avons mis en évidence que les étapes initiales du cycle viral du VHC sont sensibles à des réactifs affectant les microtubules, tels que la vinblastine qui en inhibe la polymérisation, le nocodazole qui les dépolymérisent ou encore le paclitaxel qui les stabilisent. L'inhibition de l'infection observée suite à l'action de ces substances suggère que le phénomène d'instabilité dynamique des microtubules est impliqué dans l'internalisation du VHC et les étapes précoces de transport du virus (étapes post-fusion).

Premièrement, nous présentons la preuve que le réseau de microtubules joue un rôle capital dans l'entrée du VHC dans la cellule et dans les étapes précédant la fusion, en utilisant le modèle HCVpp, en collaboration avec l'équipe de Dubuisson. Nous démontrons que les étapes précoces d'internalisation du virus, depuis son attachement à la surface de la cellule jusqu'à la fusion des glycoprotéines d'enveloppe virales dans un compartiment endosomal, dépendent de l'intégrité du réseau de microtubules. En effet, la vinblastine, qui bloque l'infection par HCVpp, diminue également l'entrée virale d'autres pseudoparticules virales telles que VSV-Gpp qui requiert un transport endosomal dépendant des microtubules.
Deuxièmement, nous avons posé la question si des étapes post-fusion du cycle viral, conduisant à une infection productive, dépendent également du transport sur les microtubules. Nous avons montré que l'étape post-entrée du cycle viral, après fusion de l'enveloppe virale, dont la fin est estimée à 2h après l'initiation de l'infection, requiert des microtubules fonctionnels. Une diminution significative de la production de virus a été observée lorsque de la vinblastine était ajoutée à différents temps, ceci jusqu'à 4h post-infection.
Ces données montrent qu'un réseau de microtubules intact est requis lors des évènements précoces du cycle viral du VHC, et probablement après la libération de la nucléocapside virale et son transport précoce. L'effet de ces réactifs affectant les microtubules est concentration-

dépendante et pourrait donc refléter les mécanismes impliqués dans l'interaction du virus avec les microtubules. Nous avons observé un effet significatif de la vinblastine et du nocodazole sur l'initiation de l'infection, même lorsque leur concentration était très faible. En effet, à des concentrations micromolaires, le nocodazole induit une dépolymérisation des microtubules et la formation d'agrégats de tubuline. A de faibles concentrations, il supprime l'association et la dissociation de la tubuline, stabilisant les microtubules, mais n'altère pas l'équilibre entre les polymères de microtubules et la tubuline soluble. De même, des concentrations nanomolaires de vinblastine n'entrainent pas de changements majeurs dans la structure des microtubules. Cependant, à ces concentrations, la vinblastine est connue pour supprimer l'instabilité dynamique et le mécanisme de treadmilling des microtubules. Le paclitaxel a également un effet inhibiteur significatif sur l'établissement d'une infection productive. L'ensemble de ces données suggère donc que le transport précoce du virus dépend de l'instabilité dynamique et/ou du treadmilling des microtubules.

Notre groupe a démontré une propriété unique de la protéine de capside du VHC : sa capacité d'interagir avec la tubuline α et β. Au moyen d'analyses par protein chips (SELDI-TOF) et d'expériences de coprécipitation suivies de spectrométrie de masse (MALDI-TOF), la tubuline α et β ont été identifiées comme partenaire cellulaire de la protéine de capside. Des analyses par résonance magnétique de surface (SPR, BIAcore) ont confirmé la liaison directe de la partie Nt de la protéine de capside, avec une très forte affinité (constante de dissociation K=75nM), aux hétérodimères de tubuline α/β, *via* le domaine D1 (aa 2 à 117). Plus important, la protéine de capside, et précisément son domaine I, augmente la polymérisation des microtubules *in vitro*. Nous avons montré par microscopie électronique la protéine de capside associée, au moins temporairement, aux microtubules polymérisés *in vitro* en sa présence.
En analysant des cellules transfectées, des études en microscopie confocale ont permis d'observer la juxtaposition de celle-ci avec les microtubules dans les cellules infectées par le VHC, même si la colocalisation parfaite n'a pas pu être observée par ces techniques.
Nos études suggèrent que l'établissement d'une infection productive par le VHC requiert un processus dynamique dirigé par la polymérisation des microtubules. Un tel mécanisme a été rapporté pour le VHB du canard (Funk et al. 2004) ou le HHP-8 (Naranatt et al. 2005). En effet, pour ces virus, les étapes précoces de l'infection, succédant l'entrée virale, dépendent de la présence d'un réseau intact de microtubules dynamiques.

Nos résultats montrent le rôle essentiel des microtubules dans les étapes précoces de l'infection. Ils suggèrent que le VHC pourrait exploiter le réseau de microtubules et en particulier les mécanismes de polymérisation de façon à optimiser le transport viral et / ou l'assemblage du virus, pour obtenir une infection productive de la cellule. La protéine de capside pourrait jouer un rôle capital dans ces mécanismes.
Par conséquent, les microtubules pourraient fournir une nouvelle cible thérapeutique contre l'infection par le VHC.

Ces résultats ont fait l'objet d'une publication, **« Initiation of Hepatitis C Virus Infection Requires the Dynamic Microtubule Network - ROLE OF THE VIRAL NUCLEOCAPSID PROTEIN »**, dans Journal of Biological Chemistry, en 2009 (Roohvand et al. 2009).

ARTICLE 3

The Journal of Biological Chemistry Vol. 284, No. 20, pp. 13778–13791, May 15, 2009

Initiation of Hepatitis C Virus Infection Requires the Dynamic Microtubule Network
ROLE OF THE VIRAL NUCLEOCAPSID PROTEIN

Farzin Roohvand‡[1], Patrick Maillard‡[1], Jean-Pierre Lavergne§, Steeve Boulant¶, **MarineWalic**, Ursula Andréo‡, Lucie Goueslain, François Helle, Adeline Mallet**, John McLauchlan¶, and Agata Budkowska‡

[1]Participated equally in this work

‡ Unité des Hépacivirus et Immunité Innée and **Plate-Forme de Microscopie Ultrastructurale, Institut Pasteur, 25/28 Rue du Dr. Roux, Paris 75724, France,
§ Institut de Biologie et Chimie de Protéines (IBCP-UMR 5086), CNRS, Université Lyon 1, Lyon 69367, France,
¶ Medical Research Council Virology Unit, Glasgow G11 5JR, Scotland, United Kingdom,
 Institut de Biologie de Lille (UMR8161), CNRS, Université de Lille I - II, Institut Pasteur de Lille, Lille 59021, France

Initiation of Hepatitis C Virus Infection Requires the Dynamic Microtubule Network

*ROLE OF THE VIRAL NUCLEOCAPSID PROTEIN**

Received for publication, October 14, 2008, and in revised form, March 4, 2009 Published, JBC Papers in Press, March 6, 2009, DOI 10.1074/jbc.M807873200

Farzin Roohvand[‡1,2], Patrick Maillard[‡2], Jean-Pierre Lavergne[§], Steeve Boulant[¶], Marine Walic[‡3], Ursula Andréo[‡3], Lucie Goueslain[‖], François Helle[‖], Adeline Mallet[**], John McLauchlan[¶], and Agata Budkowska[‡4]

From the [‡]Unité des Hépacivirus et Immunité Innée and [**]Plate-Forme de Microscopie Ultrastructurale, Institut Pasteur, 25/28 Rue du Dr. Roux, Paris 75724, France, the [§]Institut de Biologie et Chimie de Protéines (IBCP-UMR 5086), CNRS, Université Lyon 1, Lyon 69367, France, the [¶]Medical Research Council Virology Unit, Glasgow G11 5JR, Scotland, United Kingdom, and the [‖]Institut de Biologie de Lille (UMR8161), CNRS, Université de Lille I & II, Institut Pasteur de Lille, Lille 59021, France

Early events leading to the establishment of hepatitis C virus (HCV) infection are not completely understood. We show that intact and dynamic microtubules play a key role in the initiation of productive HCV infection. Microtubules were required for virus entry into cells, as evidenced using virus pseudotypes presenting HCV envelope proteins on their surface. Studies carried out using the recent infectious HCV model revealed that microtubules also play an essential role in early, postfusion steps of the virus cycle. Moreover, low concentrations of vinblastin and nocodazol, microtubule-affecting drugs, and paclitaxel, which stabilizes microtubules, inhibited infection, suggesting that microtubule dynamic instability and/or treadmilling mechanisms are involved in HCV internalization and early transport. By protein chip and direct core-dependent pull-down assays, followed by mass spectrometry, we identified β- and α-tubulin as cellular partners of the HCV core protein. Surface plasmon resonance analyses confirmed that core directly binds to tubulin with high affinity via amino acids 2–117. The interaction of core with tubulin *in vitro* promoted its polymerization and enhanced the formation of microtubules. Immune electron microscopy showed that HCV core associates, at least temporarily, with microtubules polymerized in its presence. Studies by confocal microscopy showed a juxtaposition of core with microtubules in HCV-infected cells. In summary, we report that intact and dynamic microtubules are required for virus entry into cells and for early postfusion steps of infection. HCV may exploit a direct interaction of core with tubulin, enhancing microtubule polymerization, to establish efficient infection and promote virus transport and/or assembly in infected cells.

HCV[5] infection is a major cause of chronic liver disease, which frequently progresses to cirrhosis and hepatocellular carcinoma. HCV represents a global public health problem, with 130 million people infected worldwide. There is currently no vaccine directed against HCV and the available antiviral treatments eliminate the virus in 40–80% of patients, depending on the virus genotype (for review, see Ref. 1).

HCV has a single-stranded, positive-sense RNA genome of ~9.6 kilobases encoding a large polyprotein that is processed by both host and viral proteases to produce three structural proteins (core protein and the envelope glycoproteins E1 and E2), p7, and six nonstructural proteins, which are involved in polyprotein processing and replication of the virus genome (for review, see Ref. 2).

HCV core is a basic protein, synthesized as the most N-terminal component of the polyprotein, and is followed by the signal sequence of the E1 envelope glycoprotein (3). The polypeptide is cleaved by signal peptidase and signal peptide peptidase, resulting in the release of core from the endoplasmic reticulum membrane and its trafficking to lipid droplets (3–5). Mature core protein forms the viral nucleocapsid (6) and consists of two domains, D1 and D2. D1 lies at the protein N terminus, is composed of about 117 amino acids (aa), and is involved in RNA binding (7). D2 is relatively hydrophobic, has a length of about 55 aa, and targets HCV core to lipid droplets (8).

Microtubules (MTs) are ubiquitous cytoskeleton components that play a key role in various cellular processes relating to cell shape and division, motility, and intracellular trafficking (9). MTs are dynamic, polarized polymers composed of α/β-tubulin heterodimers that undergo alternate phases of growth and shrinkage, dependent on so-called "dynamic instability" (10). Active transport by MTs is bidirectional and involves both plus and minus end-directed motors: kinesin and dynein (11, 12).

Another mechanism of cytosolic transport on MTs, called "treadmilling" (13, 14) involves polymerization at the plus end and depolymerization at the minus end after severing of MTs by cellular katenin (15).

MTs have important functions in the life cycle of most viruses (13, 16, 17). Cytoplasmic transport on MTs provides

* This work was supported in part by grants from the Agence Nationale de Recherche sur le SIDA et les Hépatites Virales (ANRS) and Action Concerté de l'Institut Pasteur.

[1] Supported by fellowship grants from the Réseau de l'Institut Pasteur (RIP) and the ANRS.

[2] Both authors contributed equally to this work.

[3] Supported by doctoral fellowship grants from the ANRS.

[4] To whom correspondence should be addressed. Tel.: 33-14568-8261; Fax: 33-14061-3012; E-mail: agata.budkowska@pasteur.fr.

[5] The abbreviations used are: HCV, hepatitis C virus; HCVcc, cell culture-produced hepatitis C virus; MT, microtubule; SPR, surface plasmon resonance; HCVpp, pseudoparticles harboring envelope glycoproteins of hepatitis C virus; GADPH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; SELDI, surface-enhanced laser desorption ionization; MALDI, matrix-assisted laser desorption ionization; TOF, time of flight; aa, amino acids; RT, reverse transcription; qRT, quantitative reverse transcription; PBS, phosphate-buffered saline; MS, mass spectrometry; MOWSE, molecular weight search.

viruses with the means to reach sites of replication or enables progeny virus to leave the infected cell. Some viruses, such as Ebola virus (18) or reovirus (19), are transported on MTs within membranous compartments, whereas other viruses like herpes simplex virus type 1 (20), murine polyoma virus (21), human cytomegalovirus (22), or adenovirus (23) interact with MT motors or MT-associated proteins to allow their transport along microtubules.

Previous studies have established that the cell cytoskeleton is involved in HCV replication, since HCV replication complexes are subjected to intracellular transport and their formation is closely linked to the dynamic organization of endoplasmic reticulum, actin filaments, and the microtubule network (24–26). In addition, intact microtubules are essential for viral morphogenesis and the secretion of progeny virus from infected cells (27). The role of microtubules in HCV cell entry and the initiation of productive HCV infection has not yet been addressed.

In this study, we provide evidence that the MT network plays a key role in HCV cell entry and postfusion steps of the virus cycle that lead to the establishment of productive HCV infection. The initial steps of the viral cycle are sensitive to MT-affecting drugs that inhibit MT formation or depolymerize or stabilize microtubules. We also show a unique property of the HCV core protein, its capacity to directly bind to tubulin and to enhance MT polymerization *in vitro*. Our findings suggest that HCV could exploit the MT network by polymerization-related mechanisms to productively infect its target cell. Thus, microtubules may provide a novel target for therapeutic interventions against HCV infection.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Reagents and Antibodies—Rabbit antibodies against α- and β-tubulin were from AbCam. Fluorescein isothiocyanate-conjugated goat anti-mouse IgG (H+L) was purchased from Jackson Inc.; Alexa Fluor 568-labeled goat anti-mouse IgG(H+L), Alexa Fluor 488-labeled goat anti-rabbit IgG (H+L), and Texas Red-labeled anti-phalloidin antibodies were from Invitrogen. Control mouse and rabbit IgG were from Pierce and Santa Cruz Biotechnology, Inc., respectively.

Recombinant HCV Core Proteins—Recombinant His_6-tagged HCV core proteins aa 2–169, aa 2–122, and aa 2–117 were produced in *Escherichia coli* and purified in native conditions on nickel-nitrilotriacetic acid-agarose and by reverse-phase high pressure liquid chromatography on a VYDAC C8 column, as previously described (28, 29). Core proteins were handled in 0.1% *n*-dodecyl-D-maltoside to ensure their native conformation. This detergent was present in BIAcore and tubulin polymerization experiments.

Cell Cultures—Human hepatoma Huh7 and Huh7.5 cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen) containing 10% fetal calf serum and glutamine. Huh7.5 cells were supplemented with pyruvate and with 1% nonessential amino acids, antibiotics, and antifungal agents. 293T human embryo kidney cells (HEK 293T) and PLC/PRF/5 human hepatoma cells (ATCC CRL-8024) were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal calf serum.

Infection of Huh7.5 Cells with the JFH-1 Strain of HCVcc—The JFH-1 plasmid encoding the genome of the JFH-1 strain of HCV was kindly provided by T. Wakita (30) and used to generate HCVcc. The virus was cultured as described previously (30) to obtain a virus stock of $\sim 1.4 \times 10^6$ focus-forming units/ml (5×10^7 IU/ml). Cells were incubated with infectious JFH-1 (40 μl containing 6×10^4 focus-forming units of virus) for 2 h at 37 °C to allow infection. After 2 h, cells were washed and incubated with complete Dulbecco's modified Eagle's medium for the indicated times at 37 °C.

To assess the effect of cytoskeleton-affecting drugs on the initiation of HCV infection, Huh7.5 cells were grown for 48 h to obtain $\sim 1 \times 10^6$ cells/well. The cells were incubated with complete medium containing 0.37 μM to 30 μM nocodazole, 1 nM to 30 μM vinblastin, 20 μM cytochalasin D, or 1–5 μM paclitaxel, the drugs being added before or at different time points postinfection. The amount of HCV RNA in infected cells was determined by quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) 16–24 h postinfection. After treatment with drugs, cell viability was assessed by staining with trypan blue. The results were normalized by quantification of the RNA of GAPDH, the housekeeping cellular gene using the GAPDH control kit from Eurogentec.

Quantitative Real Time RT-PCR—HCV RNA was quantified by one-step real time qRT-PCR with the SuperScript® III Platinum® one-step qRT-PCR kit (Invitrogen), as described previously (31). HCV RNA was quantified relative to a reference serum, standardized with an HCV RNA quantification panel from AcroMetrix.

Cell Infection with HCVpp—Pseudoparticles were produced as described previously in human embryo kidney cells (HEK 293T) (32–34). 293T cells were co-transfected with a murine leukemia virus-based transfer vector encoding luciferase, a murine leukemia virus Gag-Pol packaging construct, and an envelope glycoprotein-expressing vector (either phCMV-E1E2, phCMV-G, or phCMV-RD114) using Exgen500 (Euromedex). The phCMV-E1E2, phCMV-G, and phCMV-RD114 expression vectors encode the HCV glycoproteins E1 and E2, the vesicular stomatitis virus G protein, and the feline endogenous virus RD114 glycoprotein, respectively. Supernatants containing pseudotyped particles were harvested 48 h after transfection, filtered through 0.45-μm pore-sized membranes, and incubated with 300 units/ml DNase I for 30 min at 37 °C to remove excess plasmid DNA (35).

To investigate the influence of vinblastin on HCVpp cell entry, confluent monolayers of PLC/PRF/5 cells were incubated for 30 min at 37 °C with 30 μM vinblastin in the culture medium and infected with 600 μl of DNase-treated HCVpp in the presence of 30 μM vinblastin. The presence of vinblastin was maintained during 3 h of cell-virus contact, and HCVpp assays were carried out as previously described (35).

HCV Replicon—Huh7 cells harboring the subgenomic JFH1 replicon were obtained and grown as previously described (36). Intracellular levels of HCV RNA were determined by qRT-PCR as described above.

Immunofluorescence Microscopy—Cells were fixed in 4% paraformaldehyde, permeabilized with 0.5% Triton X-100, and saturated in PBS containing 0.1% Tween 20 and 1% gelatin overnight at 4 °C. Cells were then incubated with primary anti-

body (for 1 h at room temperature) and washed with PBS containing 0.1% Tween 20. After staining with fluorochrome-labeled secondary antibodies, the cells were mounted in Vectashield medium (Vector Laboratories) and examined under a fluorescence microscope (Zeiss Axiovert 200M) equipped with the ApoTome system.

Confocal Microscopy—Cells were fixed for 20 min in methanol at −20 °C. Indirect immunofluorescence and 4′,6-diamidino-2-phenylindole staining were performed as described previously (8, 37). Microtubules were labeled using monoclonal anti-tubulin antibody and fluorochrome-conjugated secondary anti-mouse antibody. Core was stained with rabbit antibody, followed by fluorochrome-labeled secondary antibody. Cells were then examined with a Zeiss LSM510 META inverted confocal microscope. Images were recorded with a Plan-Apochromat ×63 lens (numerical aperture 1.4). For Z-stack analysis, 25 images were recorded at 0.14-μm intervals. For the three-dimensional reconstructions, Z-stack images were collected using optimum intervals, generating 20–25 slices/sample. Image stacks were deconvolved by three-dimensional blind deconvolution (20 iterations) using Autodeblur software (Media Cybernetics). Three-dimensional reconstructions were created with the five-dimensional viewer extension in the isosurface mode using a bin factor of 1.

Preparation of Cell Extracts from Huh7 Cells—Cell extracts from hepatoma cells were prepared as previously described (38). Briefly, 3–5 × 10^6 cells were detached from the surface of the flask by EDTA treatment, collected by centrifugation, washed with cold PBS, resuspended in PBS supplemented with 2% Nonidet P-40 and EDTA-free protease inhibitor mixture (Roche Applied Science), and incubated for 30 min on ice. Cell debris and nuclei were removed by centrifugation. Aliquots of supernatant were frozen and stored at −80 °C.

Protein Chip SELDI-TOF Mass Spectrometry (MS) Analyses—The IMAC3 Protein Chip Array (Ciphergen Biosystems) was incubated with 60 μl of 100 mM $NiCl_2$ for 15 min at 20 °C. After washing, core protein (2 μg in 50 μl of PBS) was spotted onto the chip, incubated for 50 min at 20 °C, and washed in 0.1% Triton X-100 in PBS. We then spotted 30–60 μg of cell extracts in the same buffer onto the chip, and incubated it for 1 h at 20 °C. The chip was washed with PBS containing 5 mM HEPES, and energy-absorbing molecule solution was loaded onto the sample and retained on the chip surface. An unrelated His_6-tagged protein or PBS was used as a negative control. The Ciphergen protein chip reader (PBS II model) was used to analyze the arrays, and the data were processed with Protein Chip software version 3.2.1.

Pull-down Assays—Pull-down experiments using IMAC (BIOSEPRA)-cellulose beads were employed to identify putative cellular partners of the HCV core protein present in cell extracts. His_6-tagged core proteins were immobilized on Ni^{2+}-coated cellulose beads. Beads were then incubated with 50–70 μg of cell extracts for 20–120 min at 4 or at 20 °C, washed in a buffer containing 0.1%, Triton X-100 and 5 mM HEPES in PBS, suspended in 30 μl of Laemmli buffer, and analyzed by SDS-PAGE. Gels were stained with Coomassie Brilliant Blue.

Peptide Mass Mapping and Bioinformatic Analyses—Matrix-associated laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) was used to identify proteins of interest isolated by pull-down assays followed by SDS-PAGE separation, using the procedure originally described by Shevchenko *et al.* (39). Briefly, protein bands stained with Coomassie Blue were excised from the gel, washed, reduced, *S*-alkylated, and digested with sequencing grade porcine trypsin (Promega) overnight at 37 °C. The resulting peptides were extracted and desalted using ZipTips (Millipore). Peptide mass was analyzed with an 0.5-μl tryptic digest mixture, containing 0.5 μl of saturated cyanohydroxycinnamic acid (Sigma). The results were analyzed by MALDI-TOF MS (Voyager DE STR; Applied Biosystems). Proteins were identified by searches of the Swiss-Prot data base, using a local copy of the MS-FIT 3.2 part of the PROTEIN PROSPECTOR package.

Surface Plasmon Resonance (SPR) Analyses—Real time binding experiments were carried out with a BIAcore 3000 biosensor system (BIAcore, Uppsala, Sweden). All experiments were performed at 25 °C, at a flow rate of 20 μl/min. The eluent consisted of 10 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 50 mM EDTA, and 0.005% P20 surfactant. The dispenser buffer consisted of 10 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, and 0.005% P20. Core proteins, aa 2–169 or aa 2–117, were immobilized via their C-terminal His_6 tag residues on the surface of an nitrilotriacetic acid sensor chip, previously activated with 500 mM $NiCl_2$. Bovine tubulin (at concentrations of 50, 100, 250, 500, and 1,000 nM) was injected in dispenser buffer, pH 7.4. Changes in surface concentration resulting from the interaction of tubulin with surface-fixed core protein were detected as an optical phenomenon affecting the SPR signal, expressed in RU, where 1 RU corresponds to an immobilized protein concentration of 1 pg/mm^2. The results obtained for a blank, produced by injecting tubulin into a mock sensorchip, were subtracted from each sensogram.

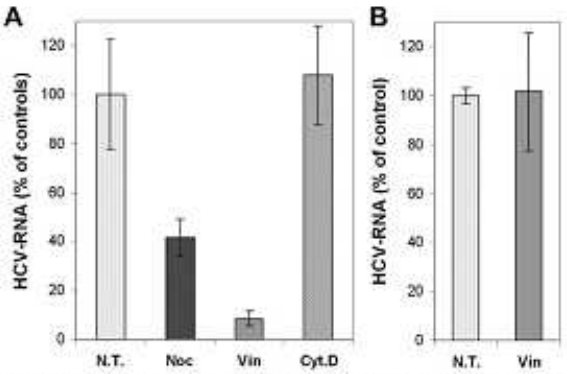


FIGURE 1. Intact microtubule network is required for the establishment of productive HCV infection. *A*, Huh7.5 cells were pretreated for 30 min with 20 μM nocodazol, 30 μM vinblastin, or 20 μM cytochalasin D. Infection of Huh7.5 cells with JFH1 HCV strain was subsequently carried out for 2 h in the presence of these compounds, and then cells were washed and cultured for 16 h in the absence of drugs. The levels of infection were determined by quantification of HCV RNA by qRT-PCR. The results were normalized by quantification of RNA corresponding to GAPDH, the housekeeping gene, and presented as a percentage of HCV RNA as compared with nontreated cells (100%). *Dotted bar*, control, untreated cells (*N.T.*). *B*, control experiments to show that vinblastin does not affect HCV binding to cells. Huh7.5 cells were incubated with cold medium containing 20 μM vinblastin for 30 min and then incubated with JFH1 for 2 h at 4 °C. Cells were washed, and virus bound to the cells in the presence or absence of vinblastin (*N.T.*) was quantified by qRT-PCR.

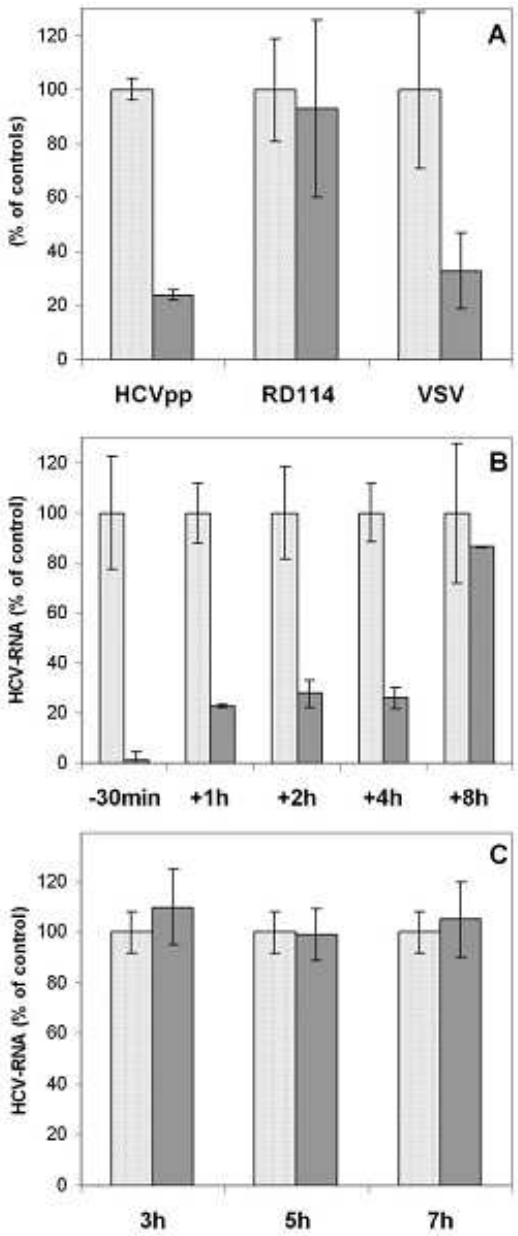


FIGURE 2. **Intact microtubules are required for HCV entry into cells and early postentry steps of infection.** *A*, vinblastin inhibits HCVpp cell entry. Cells were infected with pseudoviral particles expressing on their surface either the HCV envelope proteins (*HCVpp*) or particles harboring VSV-G or RD114 glycoproteins in the presence (*gray bar*) or absence of vinblastin (*dotted bar*). Cells were preincubated with 30 μM vinblastin for 30 min and infected with pseudoviral particles in the presence of the drug, which was maintained for 3 h. Results are expressed as percentage of virus cell entry relative to murine leukemia virus cDNA copies (normalized by quantification of the DNA from the albumin gene) in the presence or absence of the drug. RD114pp cell entry is not affected by vinblastin, as expected for a virus that does not require endosomal transport and enters the cell by direct fusion at the plasma membrane. *B*, vinblastin inhibits early, postfusion steps. Cells were incubated with the JFH1 strain of HCV for 30 min at 4 °C to bind the virus, and then unbound virus was removed by washing, and cells were incubated for 2 h at 37 °C. Vinblastin (10 μM) was applied at different time points: 30 min before infection (*−30min*) or 1 h (*+1h*), 2 h (*+2h*), 4 h (*+4h*), or 8 h (*+8h*) postinfection. Cells were then cultured in the presence of the compound, and the levels of intracellular RNA were determined by qRT-PCR 16 h postinfection. The results were normalized by the determination of RNA corresponding to GAPDH and presented as a percentage of HCV RNA as compared with nontreated cells grown in the same experimental conditions (100%). *C*, vinblastin does not inhibit the subgenomic JFH1 replicon. Huh7 cells expressing JFH1 subgenomic HCV replicon were treated with 30 μM vinblastin for 3, 5, and 7 h. Intracellular HCV RNA was then quantified by qRT-PCR. Results obtained were normalized by quantification of RNA corresponding to GAPDH and presented as a percentage of HCV RNA as compared with nontreated cells. Vinblastin-treated cells are shown as a *gray bar*, and untreated cells are shown as a *dotted bar*.

Tubulin Polymerization Assay—To investigate the effect of the core protein on tubulin polymerization, we used the fluorescence-based *in vitro* tubulin polymerization assay kit from Cytoskeleton (Denver, CO). This assay is based on fluorescence enhancement due to the incorporation of a fluorescent reporter into MTs as polymerization occurs. The assay was carried out using highly purified tubulin (99% pure). HCV core proteins were used in a concentration range of 5–200 μg/ml. The reading parameters in SAFAS SP-2000 were set as follows. Fluorescence wavelengths were 360 nm for excitation and 420 nm for emission, and kinetics were of one reading/min at 37 °C.

Electron Microscopy—The effect of core on MT formation *in vitro* was controlled by electron microscopy. The polymerization assays were carried out as described above in the presence of 20 μg/ml core protein aa 1–117 or in the absence of core and in the presence or absence of MT-affecting drugs (3 μM nocodazol or 3 μM paclitaxel). Microtubules were then fixed with 2.5% glutaraldehyde and stained with 4% uranyl acetate. Grids were examined in a Jeol electron microscope 1200 EX at 80 kV at a magnification of ×120,000.

RESULTS

Initiation of HCV Infection Requires the Intact MT Network—The JFH1 strain of HCV (2a genotype) generates infectious virus particles in the hepatoma cell line Huh7.5, which are released from cells and are capable of establishing productive infection in naive Huh7.5 cells. To determine whether the cytoskeleton plays a role in HCV cell entry and the initiation of the HCV life cycle, the effects of MT-affecting drugs vinblastin and nocodazole and the actin filament-depolymerizing drug cytochalasin D were investigated using this HCVcc infection model.

Huh7.5 cells were incubated with drugs for 30 min before and 2 h during infection with HCVcc. The efficiency of infection in treated *versus* nontreated cells was determined by measuring the levels of HCV RNA produced in cells cultured in the medium without drugs 16 h postinfection by qRT-PCR. Since these drugs could have a toxic effect, cell viability of drug-treated and nontreated cells was compared after trypan blue staining. In addition, the results obtained by qRT-PCR were normalized by comparative quantification of GAPDH RNA.

Nocodazole or vinblastin resulted in a substantial reduction of HCV RNA levels as compared with untreated cells (Fig. 1*A*). These findings contrasted with those obtained in the presence of the actin filament-depolymerizing drug cytochalasin D,

which did not show any significant effect on HCV RNA levels. In control experiments carried out at 4 °C (when endocytosis is blocked), we excluded the effect of MT-affecting drugs on virus attachment (Fig. 1*B*). These results indicated that MTs but not actin filaments are required for the initiation of HCV infection.

Intact Microtubule Network Is Required for HCV Cell Entry—The observed inhibition of cell infection by MT-affecting drugs could involve virus cell entry (from virus binding at the plasma membrane until the release of the nucleocapsid from the endocytic vesicle) or rather later steps following fusion and liberation of the viral nucleocapsid. To investigate whether microtubules are involved in early endocytic events occurring between virus attachment at the plasma membrane and fusion mediated by the E1E2 envelope glycoproteins, we used pseudoviral particles presenting the HCV envelope glycoproteins on a retroviral core (HCVpp model) (32–34). Hepatoma cells were pretreated with vinblastin for 30 min before infection, and the drug was maintained during cell infection with HCVpp. HCVpp cell entry was measured using a PCR-based assay, which quantifies the amount of retroviral genome after retrotranscription that occurs following capsid delivery to the cytoplasm of the target cell (35).

Pseudotyped particles harboring VSV-G or RD114 glycoproteins on their surface were employed as controls to exclude a nonspecific effect of the drugs or their influence on the fusion process. As shown in Fig. 2*A*, HCVpp cell entry was significantly reduced in the presence of vinblastin. The drug equally reduced cell entry of control pseudotypes VSV-Gpp, which also require MT-dependent endocytic transport. In contrast, cell entry of RD114pp was not affected, as expected for a virus known to enter the cell by direct fusion at the plasma membrane. Hence, we conclude that early endocytic events of HCV cell entry occurring between virus attachment at the plasma membrane and fusion mediated by the E1E2 envelope glycoproteins require an intact MT network.

Intact Microtubule Network Is Also Required for Early "Postentry" Steps—In addition to their role in virus entry into cells from virus binding until the fusion mediated by virus envelope proteins, which can be analyzed using the HCVpp model, functional MTs may play an important role at postentry steps, after fusion and release of the virus nucleocapsid into the cytosol. These steps cannot be investigated using the HCVpp model, which is based on retrovirus core and thus does not contain HCV core protein.

We therefore investigated, using the HCVcc JFH1 model, whether MT-affecting compounds can inhibit early postentry steps after virus fusion, which is considered to be completed by 2 h after infection. MT-affecting drugs were applied at different time points before or after infection. The cells were thus treated either with 10 μM vinblastin for 30 min 30 min before infection or infected with HCV and grown for 1, 2, 4, or 8 h and then treated with the drug. HCV RNA levels were quantified by RT-PCR after 16 h in drug-treated cells, compared with nontreated cells. As shown in Fig. 2*B*, a significant decrease in the production of the virus was observed when vinblastin was applied up to 4 h postinfection. Vinblastin applied 8 h postinfection had no effect on abundance of intracellular HCV RNA, measured after 16 h.

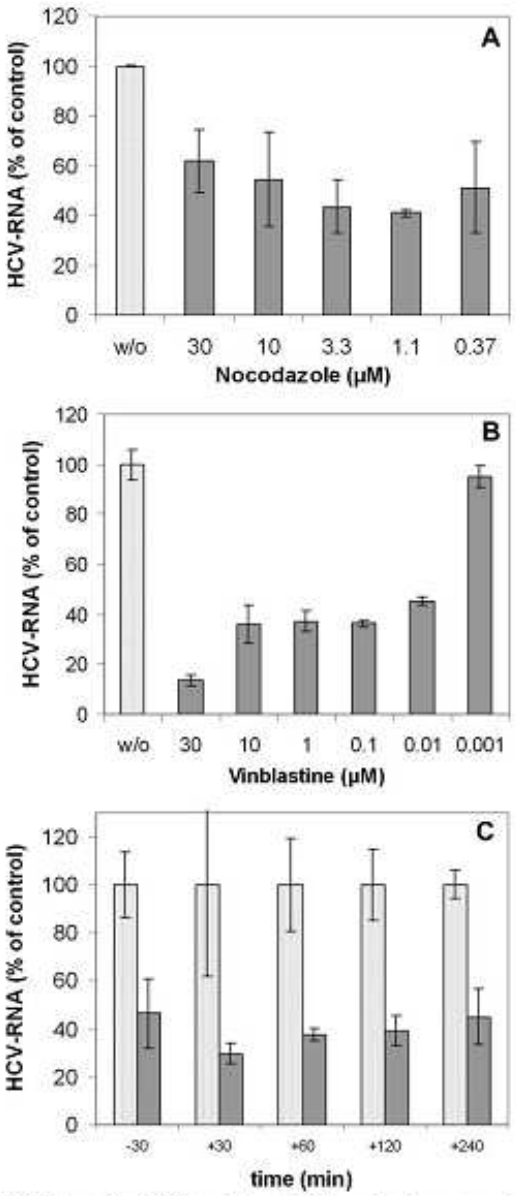


FIGURE 3. Dynamic instability and/or treadmilling mechanisms are required for the initiation of HCV infection. Huh7.5 cells were pretreated with the indicated concentrations of nocodazol (*A*) or vinblastin (*B*) for 30 min. Infection of cells with JFH1 was subsequently carried out for 2 h in the presence of these compounds, and then cells were washed and cultured for 16 h in the absence of the drugs. *C*, influence of paclitaxel on the initiation of HCV infection. Cells were incubated with the JFH1 strain of HCV for 30 min at 4 °C to bind the virus, and then cells were washed and incubated further for 2 h at 37 °C. Paclitaxel (2 μM) was applied at different time points: either 30 min before infection (−30) or 30 min (+30), 1 h (+60), 2 h (+120) or 4 h (+240) postinfection. Cells were then washed and cultured in the presence of the compound up to 16 h postinfection. The level of infection (in *A*–*C*) were determined by the quantification of HCV RNA by qRT-PCR. The results were normalized by determination of RNA corresponding to GAPDH, the housekeeping gene, and presented as percentage of HCV RNA as compared with nontreated cells grown in the same experimental conditions (100%).

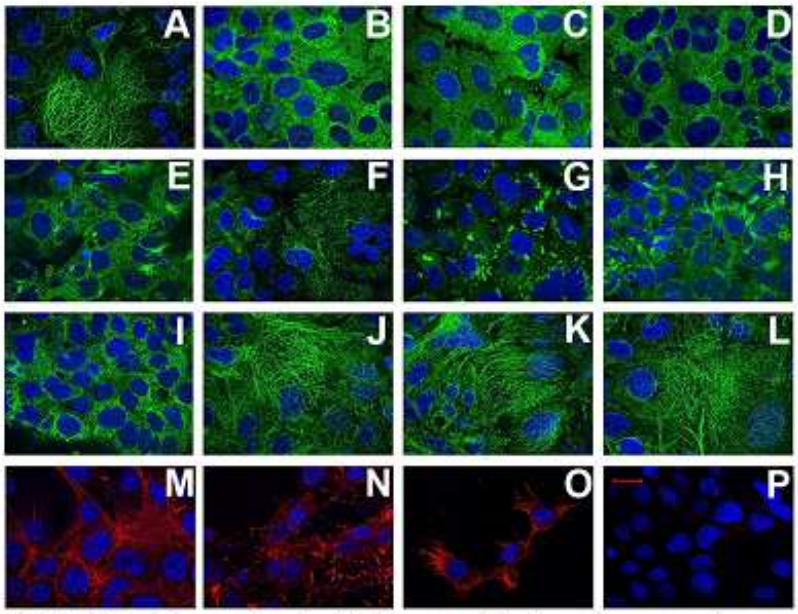


FIGURE 4. **Effect of drugs on the cell cytoskeleton assessed by immunofluorescence microscopy.** Untreated Huh 7.5 cells (*A*) and cells treated for 2 h with different concentrations of nocodazol (30 μM (*B*), 10 μM (*C*), 3.3 μM (*D*), 1.1 μM (*E*), and 0.37 μM (*F*)) are shown as are Huh 7.5 cells treated with various concentrations of vinblastin: 30 μM (*G*), 10 μM (*H*), 1 μM (*I*), 100 nM (*J*), 10 nM (*K*), and 1 nM (*L*). Staining was with rabbit anti-α-tubulin antibody followed by Alexa 488-labeled anti-rabbit IgG. Cells treated with 20 μM cytochalasin D (*N*) or nontreated cells (*M*) were stained with Texas Red-labeled anti-phalloidin antibody. *O*, cells stained with Oregon Green 488 taxol (Tubulin Tracker). Control cells stained with a nonrelated antibody, followed by Alexa 488-labeled anti-rabbit IgG, are shown in *P*. The nucleus is stained with 4′,6-diamidino-2-phenylindole. *Bar*, 20 μm.

To exclude the influence of the drug on virus replication, control experiments were carried out using a subgenomic replicon derived from the same JFH1 virus strain (36). The application of 30 μM vinblastin over a similar period of time (3–7 h) had no visible effect on intracellular HCV RNA levels as measured by qRT-PCR (Fig. 2*C*). Thus, treatment with the drug before or at the beginning of infection, substantially reduced levels of virus produced and concerned early virus transport rather than replication process. These data confirmed that the intact microtubule network is needed for early events of the HCV cell cycle, which happen until 8 h after infection. These events most probably involve virus cell entry, nucleocapsid release, and early transport, subsequent to virus fusion.

Dynamic Microtubules Are Required for the Initiation of HCV Infection—The effect of MT-affecting drugs is concentration-dependent, thus the concentration of compounds that have inhibitory effects on infection may reflect different mechanisms involved in virus interaction with MTs (40). We therefore investigated the influence of various concentrations of vinblastin and nocodazole on establishment of productive HCVcc infection. As shown in Fig. 3*A*, nocodazole used in a large range of concentrations (0.37 μM to 30 μM) had a substantial effect on the initiation of HCV infection. These concentrations of nocodazole induced visible changes in MT structure in accordance with the disassembly of tubulin polymers (Fig. 4, *B–E*), whereas lower concentrations of the compound (0.37 μM) (Fig. 4*F*) did not induce perceptible changes in microtubule structure but still impaired virus infection. The concentrations used are known to suppress MT dynamic instability (41).

Depending on its concentration, vinblastin is known to induce different effects on the structure and function of microtubules (40). In accordance with this notion, we observed that vinblastin in concentrations of 10–30 μM caused the aggregation of MTs in paracrystalline arrays (Fig. 4, *G* and *H*), whereas 1 μM vinblastin induced changes suggesting inhibition of MT assembly (Fig. 4*I*). For nanomolar concentrations of vinblastin, the changes in MT structure were not perceptible (Fig. 4, *J–L*); however, at these concentrations, vinblastin is known to suppresses MT dynamic instability and treadmilling mechanisms (20, 42). As shown in Fig. 3*B*, vinblastin concentrations as low as 10 nM to 100 nM still severely impaired HCV infection. These observations indicated that not only an intact but also a dynamic MT network is required to establish a robust HCV infection. These data suggest that MT treadmilling and/or dynamic instability mechanisms are involved in early steps of the virus cell cycle.

This conclusion was further supported by experiments carried out in the presence of paclitaxel (taxol), the MT-stabilizing drug known to block MT treadmilling mechanisms and/or their dynamic instability (20, 42). Paclitaxel, when applied at different time points either 0.5 h before infection or 0.5, 1, 2, or 4 h postinfection, induced substantial inhibitory effects on the efficiency of HCV infection (Fig. 3*C*). We conclude, therefore, that also postentry steps of the HCV cell cycle, which take place 2–8 h postinfection, require an intact and dynamic MT network. Since virus traffic during internalization and/or transport cannot take place on stabilized microtubules, our findings suggest that treadmilling and/or MT dynamic instability mechanisms might be involved in intracellular transport of the virus nucleocapsid.

Identification of α- and β-Chains of Tubulin as Core Protein Cellular Partners—The above findings raised the possibility that the HCV core protein could interact with microtubules or microtubule-related proteins during early transport of virus nucleocapsid. Thus, we searched for cellular partners that directly bind to HCV nucleocapsid protein and that could be related to MTs, by protein chip technology and pull-down assays, followed by mass spectrometry (Fig. 5).

Protein chip technology is based on capturing proteins on protein chip arrays followed by analysis on a SELDI-TOF mass spectrometer (protein chip reader). Core proteins aa 2–169 (corresponding to domains D1 + D2) and aa 2–122

(corresponding to domain D1), harboring a C-terminal histidine tag, were immobilized on IMAC3 chips, and their interactions with proteins in extracts prepared from Huh7 cells were analyzed. Profiles obtained with immobilized core proteins (Fig. 5, *A* and *B*) were compared with corresponding controls: protein chips coated with control His_6-GFP protein, analyzed with extract from hepatoma cells (Fig. 5*C*), and core protein-coated chips incubated with PBS instead of cell extracts (Fig. 5*D*).

In protein chip analyses, ~12 peaks relating to cell proteins bound to core were observed in the region corresponding to molecular masses from 11 to 60 kDa. A major peak of 50 kDa was identified in this region for both core proteins aa 2–169 and aa 2–122. This peak was not detected by protein chip analyses carried out with control, unrelated protein (Fig. 5*C*) or uncoated chips (Fig. 5*D*). Thus, the 50-kDa component was considered as a cellular partner interacting with HCV core.

Pull-down assays were then carried out with the IMAC system, also with two HCV core proteins aa 2–169 and aa 2–122 as a bait. In these experiments, different stringency conditions were used to confirm the specificity of protein/protein interactions (*e.g.* differing the amounts of cell extracts and beads and various incubation times and temperatures along with washing steps). In addition, the following series of controls was performed: (i) immobilized core proteins were analyzed to verify whether bait proteins were successfully captured to the beads; (ii) uncoated beads were used to identify cellular proteins, which could nonspecifically bind to the beads; (iii) beads were coated with a nonrelevant protein (purified His_6-tagged GFP).

As shown in Fig. 5*E*, under low stringency conditions, a major 50 kDa (P50) band was detected in SDS-PAGE, corresponding to the cellular component that bound to both core proteins aa 2–169 (composed of domains D1 + D2) and aa 2–122 (composed of domain D1). Other cellular proteins, which associated with core-coated beads, pro-

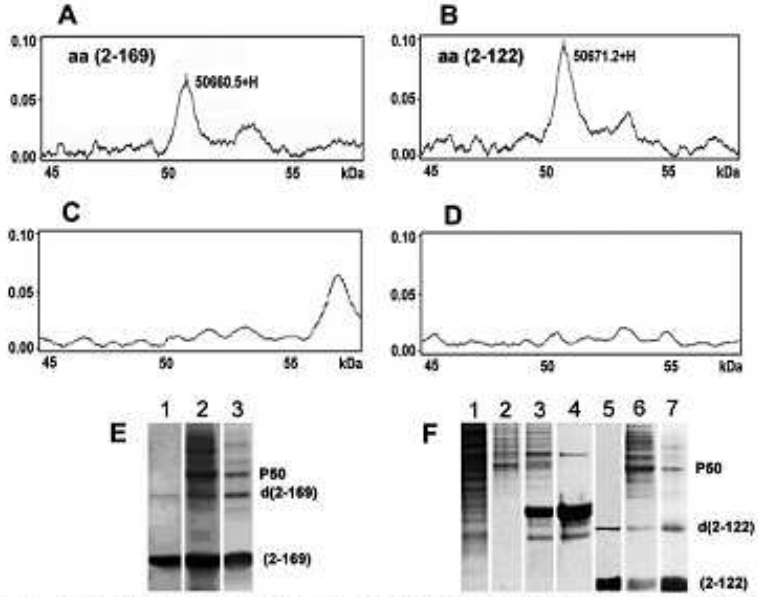


FIGURE 5. **Identification of a 50-kDa cellular component interacting with HCV core protein.** *A–D*, protein chip analyses of cellular components binding to the HCV core protein. A SELDI-TOF mass spectrometry profile of HCV core interactions with cell extracts of Huh7 cells is shown, in the region of 45–60 kDa with a peak of 50.6605 kDa corresponding to a molecule that binds to full-length core protein aa 2–169 (*A*) and a 50.6712-kDa molecule that binds to the truncated core protein aa 2–122 (*B*). The corresponding profiles obtained with a control, unrelated, His-tagged protein coated on protein chips and incubated with the same cell extracts (*C*) and the profile obtained for core aa 2–169-coated chips incubated with PBS instead of the cell extract (*D*) are shown. *E* and *F*, identification of a 50-kDa component from Huh7 cells interacting with the HCV core proteins in pull-down assays. Analyses were carried out by SDS-PAGE and followed by Coomassie Blue staining. *E*, *lane 1*, core protein aa 2–169 coated on beads; *lane 2*, core protein aa 2–169 interacting with cell extract analyzed in nonstringent conditions (10 μl of IMAC beads, 70 μl of cell extract, and incubation for 2 h at room temperature); *lane 3*, the same as *lane 2* in stringent conditions (10 μl of beads, 50 μl of cell extract, and incubation carried out for 20 min at 4 °C). *F*, *lane 1*, total cell extract of Huh7 cells; *lane 2*, Huh7 cell extract interacting with noncoated IMAC beads; *lane 3*, unrelated protein (His-tagged GFP)-coated beads analyzed with Huh7 cell extract; *lane 4*, His-tagged GFP coated on beads; *lane 5*, core protein aa 2–122-coated beads alone; *lane 6*, core aa 2–122 and cell extract analyzed in nonstringent conditions; *lane 7*, core protein aa 2–122 and cell extract analyzed in stringent conditions. P50 is a protein band identified by pull-down assays. *d(2–169)* and *d(2–122)* correspond to dimers of core proteins aa 2–169 and aa 2–122, respectively.

TABLE 1

Proteins identified by mass spectrometry

Rank	MOWSE score	Accession number (Swiss-Prot)	Number of peptides	Masses matched (%)	Protein mass	Sequence coverage	Identified protein
					kDa	%	
1[a]	1.42e+010	P05218	15	15 of 74 (20%)	49.7	31	Human β4-tubulin 5-chain
2[b]	2.36e+009	P07437	14	14 of 74 (18%)	49.8	28	Human β4-tubulin 1-chain
	2.36e+009	P05217	14	14 of 74 (18%)	49.8	28	Human β4-tubulin 2-chain
	2.36e+009	P68371	14	14 of 74 (18%)	49.8	28	Human β4-tubulin 2-chain
3[c]	1.22e+009	Q71U36	12	12 of 59 (20%)	50.1	33	Human α-tubulin 3-chain
	1.22e+009	P05209	12	12 of 59 (20%)	50.2	33	Human α-tubulin 1-chain
	1.22e+009	P68363	12	12 of 59 (20%)	50.2	33	Human α-tubulin ubiquitous or (1B) chain

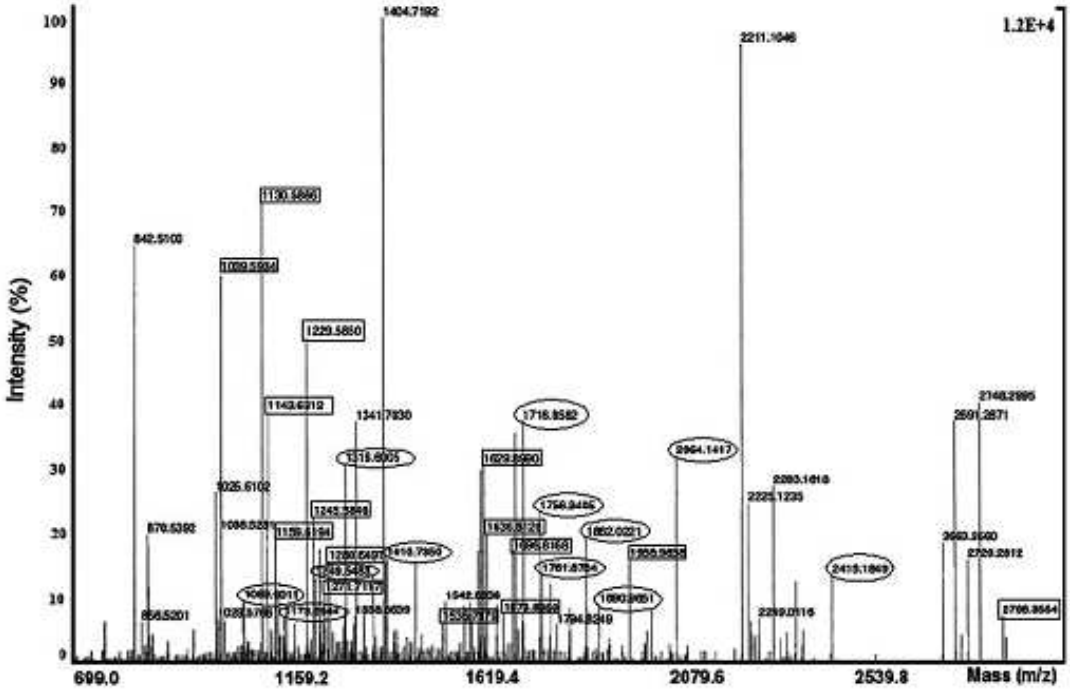
[a] The highest MOWSE score indicates that β4-tubulin (5-chain) is the most probable candidate for core interacting protein.

[b] The second candidate is β-tubulin (2-chain).

[c] The third candidate is α-tubulin (3- and/or 1-chain, or ubiquitous chain of α-tubulin). These results are indicative of the presence of both β- and α-tubulin in the sample analyzed; β-tubulin 5- and 2-chains and α-tubulin 3/1-chains are the most probable candidates for the core protein cellular partners.

ASBMB
The Journal of Biological Chemistry

A



B

Tubulin beta-5 chain - P05218

```
MREIVHIQAG QCGNQIGAKF WEVISDEHGI DPTGTYHGDS DLQLDRISVY YNEATGGKYV PRAILVDLEP 70
GTMDSVRSGP FGQIFRPDNF VFGQSGAGNN WAKGHYTEGA ELVDSVLDVV RKEAESCDCL QGFQLTHSLG 140
GGTGSGMGTL LISKIREEYP DRIMNTFSVV PSPKVSDTVV EPYNATLSVH QLVENTDETY CIDNEALYDI 210
CFRTLKLTTP TYGDLNHLVS ATMSGVTTCL RFPGQLNADL RKLAVNMVPF PRLHFFMPGF APLTSRGSQQ 280
YRALTVPELT QQVFDAKNMM AACDPRHGRY LTVAAVFRGR MSMKEVDEQM LNVQNKNSSY FVEWIPNNVK 350
TAVCDIPPRG LKMAVTFIGN STAIQELFKR ISEQFTAMFR RKAFLHWYTG EGMDEMEFTE AESNMNDLVS 420
EYQQYQDATA EEEEDFGEEA EEEA
```

Tubulin beta-2 chain - P05217

```
MREIVHLQAG QCGNQIGAKF WEVISDEHGI DPTGTYHGDS DLQLERINVY YNEATGGKYV PRAVLVDLEP 70
GTMDSVRSGP FGQIFRPDNF VFGQSGAGNN WAKGHYTEGA ELVDSVLDVV RKEAESCDCL QGFQLTHSLG 140
GGTGSGMGTL LISKIREEYP DRIMNTFSVV PSPKVSDTVV EPYNATLSVH QLVENTDETY CIDNEALYDI 210
CFRTLKLTTP TYGDLNHLVS ATMSGVTTCL RFPGQLNADL RKLAVNMVPF PRLHFFMPGF APLTSRGSQQ 280
YRALTVPELT QQMFDAKNMM AACDPRHGRY LTVAAVFRGR MSMKEVDEQM LNVQNKNSSY FVEWIPNNVK 350
TAVCDIPPRG LKMSATFIGN STAIQELFKR ISEQFTAMFR RKAFLHWYTG EGMDEMEFTE AESNMNDLVS 420
EYQQYQDATA EEEGEFEEEA EEEVA
```

Tubulin alpha-1 chain - P05209

```
MRECISIHVG QAGVQIGNAC WELYCLEHGI QPDGQMPSDK TIGGGDDSFN TFFSETGAGK HVPRAVFVDL 70
EPTVIDEVRT GTYRQLFHPE QLITGKEDAA NNYARGHYTI GKEIIDLVLD RIRKLADQCT GLQGFLVFHS 140
FGGGTGSGFT SLLMERLSVD YGKKSKLEFS IYPAPQVSTA VVEPYNSILT THTTLEHSDC AFMVDNEAIY 210
DICRRNLDIE RPTYTNLNRL ISQIVSSITA SLRFDGALNV DLTEFQTNLV PYPRIHFPLA TYAPVISAEK 280
AYHEQLSVAE ITNACFEPAN QMVKCDPRHG KYMACCLLYR GDVVPKDVNA AIATIKTKRS IQFVDWCPTG 350
FKVGINYQPP TVVPGGDLAK VQRAVCMLSN TTAIAEAWAR LDHKFDLMYA KRAFVHWYVG EGMEEGEFSE 420
AREDMAALEK DYEEVGVDSV EGEGEEEGEE Y
```

FIGURE 6. **Identification of α- and β-tubulin as HCV core-interacting proteins by MALDI-TOF analyses.** To identify the 50-kDa component interacting with core, the protein band detected by SDS-PAGE was digested with proteolytic enzymes, the resulting peptides were analyzed by mass spectrometry (MALDI-TOF MS), and results were compared with the *Swiss-Prot* data bank. *A*, MALDI-TOF mass spectrogram of 50-kDa protein. *Circles* and *rectangles* indicate peptides matched with β-tubulin and α-tubulin, respectively. *B*, amino acid sequences identified by mass spectrometry. In *boldface type* are mass matches with the human β5-tubulin and β2-tubulin chains and the human α-1 and/or 3 tubulin chains. *Underlined* are sequences allowing isotype identification.

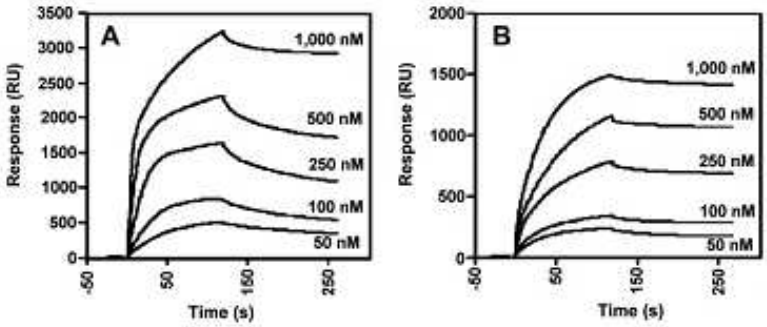


FIGURE 7. **Analysis of the interactions between HCV core and tubulin *in vitro* by SPR (BIA-core).** Binding of tubulin to *N*+His-tagged recombinant HCV core proteins aa 2–169 (D1 + D2) (*A*) and aa 2–117 (D1) (*B*) immobilized on Ni^{2+} sensor chips. Increasing concentrations of purified tubulin were injected. Results are expressed in resonance units (*RU*).

gressively disappeared under more stringent conditions (Fig. 5*F*). Thus, the 50 kDa band corresponded to the 50 kDa component detected by protein chip assays.

To identify the 50-kDa component that interacted with HCV core protein, the protein band detected by SDS-PAGE was digested with proteolytic enzymes, and the resulting peptides were analyzed by mass spectrometry (MALDI-TOF MS). The human β-tubulin 5-chain and β-tubulin 2-chain were identified as the most probable candidates for HCV core protein cellular partners, with 31 and 28% sequence coverage, respectively (Table 1). In addition, the human α-tubulin 3 and 1 isotypes were identified with 33% sequence coverage and a significant MOWSE score. These MOWSE scores strongly suggest that β- and α-tubulin chains are cellular partners that interact specifically with HCV core protein. Since β- and α-tubulins usually associate with each other, it is likely that the HCV core interacts with α/β-tubulin heterodimers.

In mammals, six α-tubulin and seven β-tubulin genes have been described (43). In liver cells, α-tubulin isotypes, such as α1A/1B and α4A +Y, and α1C and β isotypes, such as β-I, β-II, β-Vb, and β-V, are the most prevalent (44). Tubulin isotypes are defined by 15–20 amino acid residues located at the C terminus of the tubulin chain (called the isotype-defining region). Peptides matching β-tubulin allowed the identification of tubulin β5 and β2 as the most relevant β-tubulin isotypes, preferentially reacting with HCV core protein. However, none of the peptides that matched α-tubulin targeted the C-terminal isotype-defining region, which rendered impossible the discrimination between chains α1 and α3 of α-tubulin (Fig. 6*B*). We also analyzed by mass spectrometry the 50-kDa protein that bound to uncoated beads (shown in Fig. 5*F*, *lane 2*). This protein was identified as human elongation factor 1-α1 (accession number NP68104) with a 10^{-5} lower MOWSE score as compared with the human β- and α-tubulins. Since the elongation factor is a highly expressed protein, we suggest that it is a nonspecific component, which binds to cellulose beads.

We conclude from this analysis that α- and β-chains of tubulin interact with core proteins composed either of D1 + D2 or D1 alone. These findings suggest a key role of D1 in such interactions.

The HCV Core Protein Interacts with α/β-Tubulin in Vitro and in Vivo—Analyses by SPR were carried out to investigate whether core protein could directly bind to tubulin. A high purity preparation of bovine tubulin was used, which has almost complete sequence homology with human tubulin (45) and is a heterodimer composed of one α and one β chain, each with a molecular mass of 55 kDa. The molar equivalent of tubulin is typically defined as a heterodimer with a molecular mass of 110 kDa. For SPR studies, core proteins were immobilized on the nitrilotriacetic acid sensor chip by their C-terminal His residues (via Ni^{2+}), and various concentrations of tubulin were injected. As shown in Fig. 7, a direct and dose-dependent binding of tubulin to both forms of core protein was detected. The kinetic constants for core proteins aa 2–169 and aa 2–117 were determined, using various tubulin concentrations. Apparent dissociation constants ($K_{d(app)}$) were 100 nM for core protein aa 2–169 and 75 nM for core protein aa 2–117 (Fig. 7, *A* and *B*, respectively). Thus, HCV core binds directly to α/β-tubulin with high affinity, in the nanomolar range, and the interaction site is located in the N-terminal D1 domain of the protein.

Next we investigated whether HCV core can interact with tubulin and/or MTs in HCV-infected cells. Studies carried out by confocal microscopy on the JFH1 model revealed a juxtaposition of core protein with MTs in HCV-infected cells at early phase of infection (Fig. 8). These studies suggested that HCV core may also interact with MTs in HCV-infected cells.

HCV Core Protein Enhances Tubulin Polymerization in Vitro—To determine whether the binding of the HCV core protein to tubulin via D1 affects tubulin polymerization, we conducted *in vitro* tubulin polymerization analyses. This assay is based on fluorescence enhancement due to the incorporation of a fluorescent reporter to MTs as polymerization occurs, generating a polymerization curve that represents the three phases of microtubule formation: nucleation, growth, and steady state equilibrium. Compounds that interact with tubulin could alter one or more of these phases of polymerization. The addition of either of the two core proteins aa 2–169 or aa 2–117 to a tubulin polymerization reaction significantly increased the rate of microtubule polymerization to a similar extent as the antimitotic drug paclitaxel, which eliminates the nucleation phase and enhances the growth phase (Fig. 9*A*). Adding vinblastin decreased the polymerization rate and caused significant reduction in polymer mass. Various concentrations of vinblastin induced a dose-dependent decrease of microtubule mass *in vitro* (Fig. 9*B*).

We examined further whether the HCV core could promote tubulin polymerization in the presence of vinblastin. In this series of experiments, different concentrations of vinblastin and a constant concentration of HCV core were used. The polymerization process was monitored by an *in vitro* polymer-

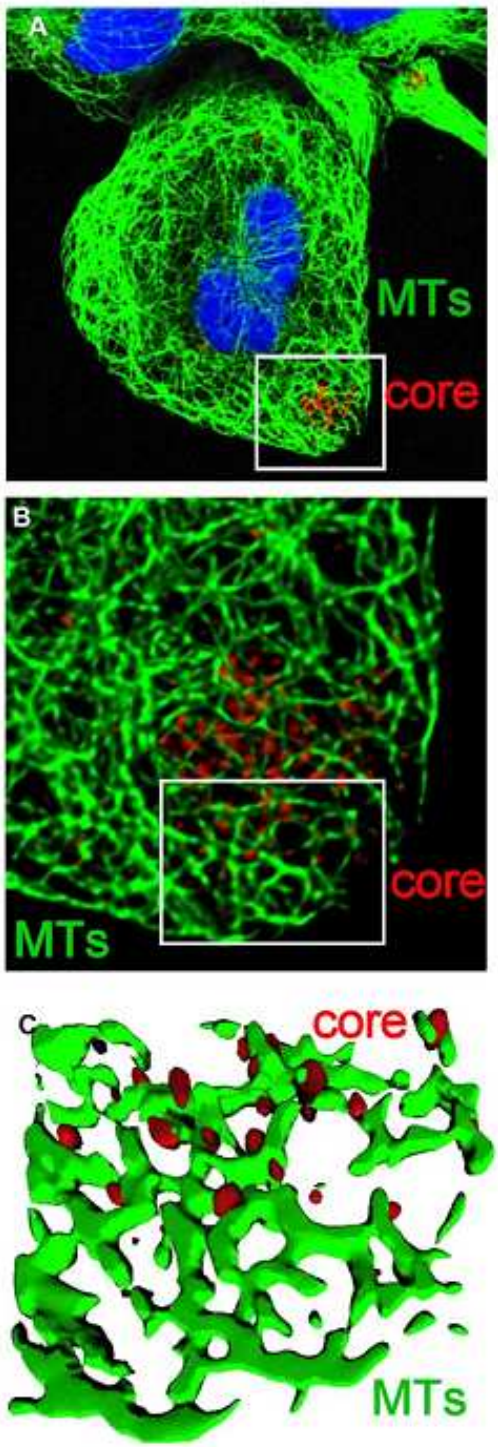


FIGURE 8. **Juxtaposition of core in HCVcc-infected cells.** *A*, Huh7.5 cells were inoculated with medium from cells electroporated with JFH-1 RNA. Cells were stained with anti-core and anti-tubulin antibody followed by fluorochrome-labeled secondary antibodies 24 h postinoculation. Cell nuclei were counterstained with 4′,6-diamidino-2-phenylindole. *B* and *C*, Z-stack analysis of the zoomed area (*white box* in *A*). *B* shows a maximal intensity projection of a Z-series generated from a stack of 20 images. To remove the blurring effect due to Z-stack acquisition, the Z-series was deconvolved using a blind deconvolution protocol. The image in *C* is a three-dimensional reconstruction of the zoomed area (indicated by the *white box*). Microtubules (in *green*) and core protein (in *red*) are represented as *solid isosurfaces*.

ization assay in comparison with standard polymerization conditions. As shown in Fig. 9*C*, in the absence of vinblastin, HCV core aa 2–122 significantly increased tubulin polymerization. Vinblastin in a concentration range from 3 nM to 3 μM decreased the core-mediated enhancement of MT formation in a dose-dependent manner. Nevertheless, in the presence of core, the effect of the drug was attenuated, as compared with that induced in the absence of core. These observations are consistent with the potent effect of the HCV core protein on tubulin polymerization and the role of the N-terminal D1 domain of core in this process.

HCV Core Protein Remains Associated with Polymerized Microtubules—To ascertain that, indeed, the HCV core protein enhances tubulin polymerization and induces formation of microtubules, MTs formed *in vitro* in the presence of core were analyzed by electron microscopy. This series of experiments demonstrated that MTs formed in the presence of core (shown in Fig. 10*D*) were very similar to those formed in the presence of paclitaxel (Fig. 10*C*), which also enhances tubulin polymerization. Strikingly, MTs polymerized in the presence of core bound anti-core antibodies, as ascertained by immune electron microscopy. These observations provided evidence that the HCV core enhances MT polymerization in the absence of other co-factors (such as MT-associated proteins) and associates, at least temporarily, with MTs (Fig. 10, *E* and *F*).

DISCUSSION

HCV is considered to enter the cell by clathrin-mediated endocytosis and fusion between the viral envelope and endosome membranes that occurs upon acidification of the endosomal compartment (35, 46). Several cell surface molecules have been identified as HCV receptors (CD-81, scavenger receptor SR-BI, Claudin-1, and occludin) (for a review, see Ref. 47); however, the mechanisms of virus traffic during cell entry and early postentry steps remain unknown.

In this report using the JFH1 *in vitro* model, which reproduces a complete virus cell cycle, and drugs affecting main cytoskeleton components, we provide evidence that intact and dynamic MTs play a key role in the early steps of the virus cycle leading to the establishment of productive HCV infection. Indeed, drugs that inhibit tubulin polymerization (vinblastin) or disrupt (nocodazol) or stabilize (paclitaxel) MTs inhibit also early steps of infection. In contrast, cytochalasin D, an inhibitor of actin polymerization and thus actin-dependent cellular transport, had no direct effect on the initiation of HCV infection.

Using virus pseudotypes (HCVpp) as a model for studies of HCV cell entry (32–35), we demonstrate that the first steps of virus internalization, from its attachment to the cell surface until fusion of the viral envelope glycoproteins within an endo-

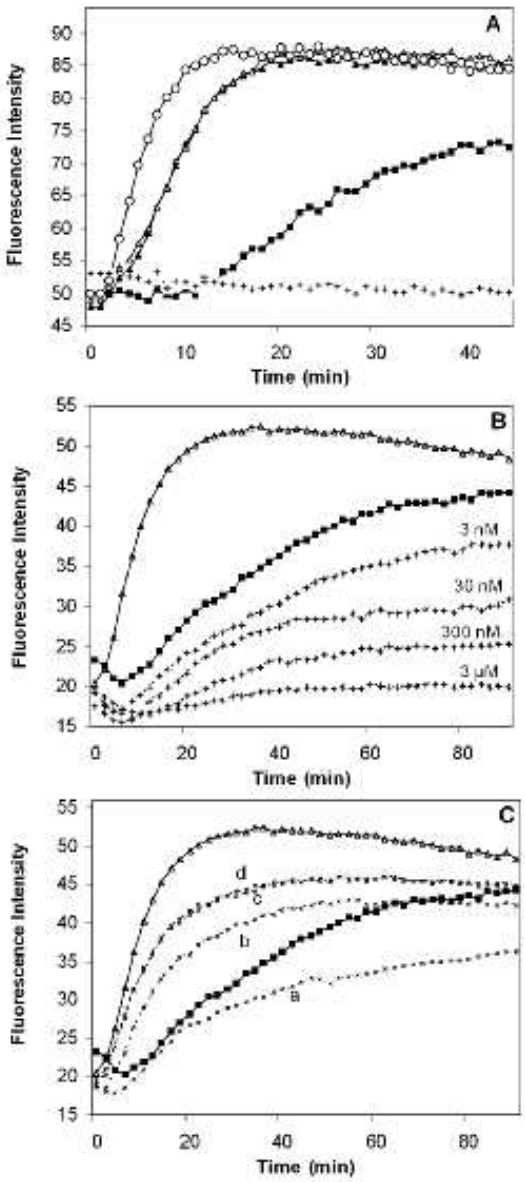


FIGURE 9. **The HCV core protein promotes polymerization of tubulin *in vitro*.** *A*, polymerization of tubulin was carried out in the absence of core protein (*filled squares*) or in the presence of core protein aa 2–169 (*open triangles*) or aa 2–117 (*filled triangles*) at a concentration of 20 μg/mL. Polymerization in the presence of vinblastin (3 μM) (*crosses*) or paclitaxel (3 μM) (*open circles*) is shown. *B*, to investigate the influence of various concentrations of vinblastin on tubulin polymerization *in vitro*, the drug was added to the standard polymerization mixture at a concentration range from 3 nM to 3 μM. The effect of the drug was monitored by a fluorescence assay as a function of time (*crosses*). Tubulin polymerization in the absence of drug (*filled squares*) and in the presence of HCV core protein aa 2–122 (*open triangles*) is shown. *C*, the HCV core protein and vinblastin were simultaneously added to the polymerization mixture. Tubulin polymerization in the absence of core (*filled squares*) and in the presence of core aa (2–122) (*open triangles*) was assessed. *Curves* (*crosses*) represent polymerization of tubulin in the presence of core protein aa 2–122 and decreasing concentrations of vinblastin (3 μM, 300 nM, 30 nM, and 3 nM, designated as *a–d*, respectively), when both compounds were added simultaneously.

somal compartment, depend on the intact MT network. Indeed, vinblastin, which blocked HCVpp infection, equally reduced cell entry of other pseudotype particles (VSV-Gpp), which require MT-dependent endocytic transport.

Our further studies carried out on the HCVcc model demonstrated also that early postentry steps of the virus cycle, after fusion of the virus envelope, which is estimated to be completed 2 h after the initiation of infection, require functional MTs. Indeed, a significant decrease in the production of the virus was observed when vinblastin was applied at various time points up to 8 h postinfection. These data showed that an intact microtubule network is needed for early events of the HCV cell cycle. These events most probably also concern virus nucleocapsid release and early transport, subsequent to virus fusion.

The effect of MT-affecting drugs is concentration-dependent and thus may reflect the mechanisms involved in virus interaction with MTs (40, 41). We observed the substantial effect of vinblastin and nocodazol on the initiation of HCV infection, when these drugs were used even in low micromolar and nanomolar concentrations. Indeed, in micromolar concentrations, nocodazole induces depolymerization of MTs and tubulin aggregation. Nocodazol at low concentrations suppresses the association and dissociation rates of tubulin, stabilizing the MT dynamics, but does not alter the equilibrium between a MT polymer and soluble tubulin. Equally, nanomolar concentrations of vinblastin do not induce perceptible changes in MT structure; however, at these concentrations, vinblastin is known to suppress MT dynamic instability and treadmilling mechanisms. Paclitaxel, an MT-stabilizing drug, also had a significant inhibitory effect on the establishment of productive HCV infection. Altogether, these findings suggested that early virus transport depends on MT dynamic instability and/or treadmilling mechanisms and thus may involve the interaction of virus core protein with microtubules.

Indeed, our observations using confocal microscopy evidenced juxtaposition of core with microtubules in HCV-infected cells. These data corroborated with our *in vitro* findings, which identified α- and β-tubulin chains as cellular proteins directly binding HCV core and evidenced direct interactions between the HCV core protein and tubulin. SPR (BIAcore) studies permitted the identification of the N-terminal D1 as a part of the core protein that directly binds to α/β-tubulin heterodimers with high affinity (in the nanomolar range). We equally provided evidence that the direct interaction of D1 of core with tubulin, without any mediators (such as MT-associated proteins), promotes tubulin polymerization *in vitro*. HCV core displayed an effect opposite to that of vinblastin, a drug that inhibits MT polymerization. When applied in the presence of vinblastin, core attenuated the inhibitory effect of the drug on MT polymerization. Our observations by electron microscopy confirmed that microtubules formed in the presence of core are very similar to those formed in the presence of paclitaxel, a drug known to enhance microtubule polymerization (48). Most importantly, immune electron microscopy analyses revealed that core protein remained associated with microtubules formed *in vitro* in its presence.

Viral genome-protein complexes, viruses, and subviral particles can be transported within the host cell cytoplasm during

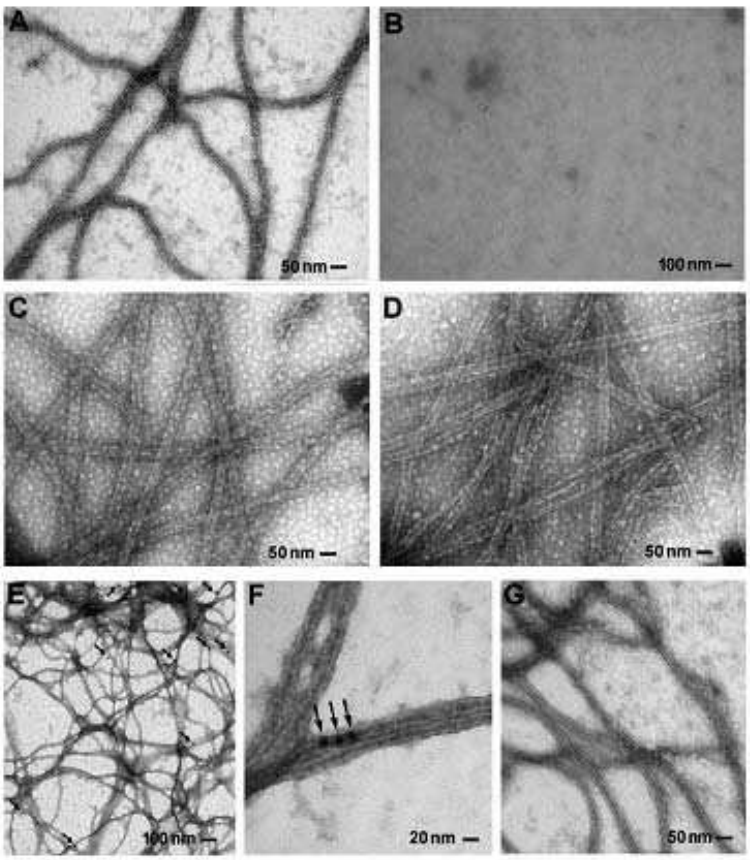


FIGURE 10. **HCV core protein promotes tubulin polymerization and associates with MTs.** *A–D*, control experiments to ascertain that MT polymerizes in the presence of core protein. *A*, microtubules formed *in vitro* in standard conditions, when tubulin (at a concentration of 2 mg/ml) was incubated in polymerization buffer for 10 min at 37 °C in the absence of drugs and HCV core protein. *B*, microtubules are not observed when Nocodazol (3 μM) is added to the MT polymerization mixture; *C*, microtubules polymerized in the presence of 5 μM paclitaxel, a drug that enhances polymerization and stabilizes microtubules; *D*, microtubules formed in the presence of HCV core protein aa 2–117 in the polymerization mixture at a concentration of 20 μg/ml. Samples were coated on Formvar grids, fixed with 2% glutaraldehyde, washed, and stained with 4% uranyl acetate. *E–G*, immune electron microscopy analyses of microtubules polymerized *in vitro* in the presence of core protein. Microtubules formed in the presence of core protein aa 2–117 (*E* and *F*) and in the presence of paclitaxel as negative control (*G*). Samples were fixed with 2% glutaraldehyde, washed, and stained with 4% uranyl acetate. *Arrows*, colloidal gold beads.

cell entry, from the plasma membrane to the site of viral replication, and during viral assembly and egress to the plasma membrane for their release into the extracellular milieu (13, 16). The association of viral proteins with microtubule components has been reported for several viruses: vaccinia virus (49), herpes simplex virus (50), murine coronavirus (51), pseudorabies virus (52), vesicular stomatitis virus (53), rotavirus (54), and M protein of Sendai virus (55). During infection, some viruses are transported on MTs within membranous vesicles (18, 19), whereas others use mechanisms driven by microtubule motors for transport of their capsids or subviral particles on MTs interacting either with microtubule motors (20–23) or with microtubule-associated proteins (56).

Only three proteins have been shown up to now to directly interact with tubulin and to enhance tubulin polymerization *in vitro*: human immunodeficiency virus Tat protein (57), tobacco mosaic virus movement protein (58), and Ebola virus matrix protein VP40 (59). Nevertheless, the exact mechanisms and role of these interactions in virus transport remain to be elucidated.

Transport of molecules along MTs can be achieved by using MT-dependent motors, such as kinesins and dyneins (11, 12, 60). These motors use energy derived from ATP hydrolysis to move cargo, but motor-driven processes are not related to polymerization and depolymerization kinetics (14). Another mechanism of cytosolic transport on MTs, called "treadmilling" (13, 14) involves polymerization at the plus end and depolymerization at the minus end after severing of MTs by cellular katenin (15). Thus, intracellular transport of the HCV core, similarly to the tobacco virus encoded movement protein or the human immunodeficiency virus Tat protein, which also enhance MT polymerization (57, 58), can be mediated by mechanisms related to tubulin polymerization.

HCV-RNA replication takes place in the cytoplasm in membrane-associated replication complexes designated as membranous webs (61). The cytoskeleton components (microtubules and actin filaments) provide tracks for the movement of replication complexes (24–26). Two types of HCV replication complexes have recently been reported; large structures, with restricted mobility appeared 24 h postinfection, and small replication complexes were formed 12–24 h postinfection and moved in a MT-dependent manner (26). These studies estimated that the formation of replication complexes starts about 12 h after the initiation of HCVcc infection, thus later than the early events analyzed in our study.

HCV morphogenesis and the secretion of progeny virus also require a functional microtubule network (27). HCV core protein probably recruits nonstructural proteins and replication complexes to lipid droplet-associated membranes, and this process is directly connected to the virus assembly pathway in HCV-infected cells (62). In HCV-infected cells, newly synthesized core protein loads lipid droplets and progressively coats the entire organelle, replacing adipocyte differentiation-related protein (37). Core protein-coated lipid droplets are transported on microtubules in a dynein-dependent manner, 48–72 h

postinfection, to the perinuclear area, where virus morphogenesis takes place (27). The above quoted studies focused either on the formation and transport of HCV replication complexes or on virus morphogenesis and release but did not address the role of microtubules in HCV cell entry and early transport. Our study provides the first evidence that a microtubule network that is both intact and dynamic plays a key role in virus internalization, leading to the establishment of infection. Although many viruses use the microtubule network for virus transport at various steps of their life cycle, our study suggests that the establishment of productive HCV infection requires a dynamic process driven by microtubule polymerization. Such mechanisms have been reported for a few viruses, such as duck hepatitis B virus or HHP-8 (63, 64). Indeed, for these viruses, early steps of infection subsequent to the virus cell entry depend on both intact microtubules and their dynamic turnover. Although this point might require further studies, our observations by electron microscopy favor the hypothesis that similarly to the tobacco virus X encoded movement protein (58) or the human immunodeficiency virus Tat protein (57), HCV core could integrate into the microtubule lattice to exploit assembly dynamics and/or treadmilling mechanisms for transport of virus nucleocapsid in infected cells.

Another possible function of the HCV core protein could be the regulation of dynein- and kinesin-based motions. Since bidirectional motion is widespread and direction of the microtubule-dependent transport depends on the balance between plus end and minus end directed motion, the cargo-based regulation of motor-MT interactions may be a key mechanism that is used to control cargo transport (11, 12, 60). Proteins showing the ability to bind to MTs independently of motors could play a crucial role in such regulation (12). In accordance with this notion, direct binding of core to tubulin and activation of microtubule polymerization could alter the balance of dynein- and kinesin-based motions. Indeed, the regulation of motor complexes by virus capsid proteins has been suggested (65), but the exact mechanism of such regulations has not yet been elucidated.

Our findings show a novel and potentially important property of the core protein and suggest that HCV might exploit the MT lattice for transport of the virus nucleocapsid by polymerization-related mechanisms. Such interactions could also play a role at later steps of the viral cycle, during viral morphogenesis and secretion. Improving our understanding of the consequences of core-MT interactions might facilitate the development of new therapeutic approaches targeted to inhibit HCV infection. Indeed, molecules modifying MT dynamics are already an integral part of anti-cancer treatment (66).

Acknowledgments—We thank Y. Rouille for valuable discussion, T. Wakita for providing the JFH-1 HCVcc clone, and J. F. Delagneau for ACAP-27 monoclonal antibody. We express our gratitude to J. D'Alayer for help in protein chip and pull-down assays and E. Perret in immunofluorescence microscopy. We are grateful to K. M. Kean for a critical review of the manuscript.

REFERENCES

1. Pawlotsky, J. M. (2004) *Trends Microbiol.* 12, 96–102
2. Penin, F., Dubuisson, J., Rey, F. A., Moradpour, D., and Pawlotsky, J. M. (2004) *Hepatology* 39, 5–19
3. McLauchlan, J., Lemberg, M. K., Hope, G., and Martoglio, B. (2002) *EMBO J.* 21, 3980–3988
4. Hope, R. G., and McLauchlan, J. (2000) *J. Gen. Virol.* 81, 1913–1925
5. Suzuki, R., Sakamoto, S., Tsutsumi, T., Rikimaru, A., Tanaka, K., Shimotohno, K., Moriishi, K., Iwasaki, T., Mizumoto, K., Matsuura, Y., Miyamura, T., and Suzuki, T. (2005) *J. Virol.* 79, 1271–1281
6. Takahashi, K., Kishimoto, S., Yoshizawa, H., Okamoto, H., Yoshikawa, A., and Mishiro, S. (1992) *Virology* 191, 431–434
7. Fan, Z., Yang, Q. R., Twu, J. S., and Sherker, A. H. (1999) *J. Med. Virol.* 59, 131–134
8. Boulant, S., Montserret, R., Hope, R. G., Ratinier, M., Targett-Adams, P., Lavergne, J. P., Penin, F., and McLauchlan, J. (2006) *J. Biol. Chem.* 281, 22236–22247
9. Nogales, E. (2000) *Annu. Rev. Biochem.* 69, 277–302
10. Heald, R., and Nogales, E. (2002) *J. Cell Sci.* 115, 3–4
11. Welte, M. A. (2004) *Curr. Biol.* 14, 525–537
12. Gross, S. P., Vershinin, M., and Shubeita, G. T. (2007) *Curr. Biol.* 17, 478–486
13. Sodeik, B. (2000) *Trends Microbiol.* 8, 465–472
14. Rodionov, V. I., and Borisy, G. G. (1997) *Science* 275, 215–218
15. Quarmby, L. (2000) *J. Cell Sci.* 113, 2821–2827
16. Dohner, K., Nagel, C. H., and Sodeik, B. (2005) *Trends Microbiol.* 13, 320–327
17. Greber, U. F., and Way, M. (2006) *Cell* 124, 741–754
18. Yonezawa, A., Cavrois, M., and Greene, W. C. (2005) *J. Virol.* 79, 918–926
19. Georgi, A., Mottola-Hartshorn, C., Warner, A., Fields, B., and Chen, L. B. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 6579–6583
20. Sodeik, B., Ebersold, M. W., and Helenius, A. (1997) *J. Cell Biol.* 136, 1007–1021
21. Sanjuan, N., Porras, A., and Otero, J. (2003) *Virology* 313, 105–116
22. Ogawa-Goto, K., Tanaka, K., Gibson, W., Moriishi, E., Miura, Y., Kurata, T., Irie, S., and Sata, T. (2003) *J. Virol.* 77, 8541–8547
23. Suomalainen, M., Nakano, M. Y., Keller, S., Boucke, K., Stidwill, R. P., and Greber, U. F. (1999) *J. Cell Biol.* 144, 657–672
24. Lai, C. K., Jeng, K. S., Machida, K., and Lai, M. M. (2008) *J. Virol.* 82, 8838–8848
25. Jones, D. M., Gretton, S. N., McLauchlan, J., and Targett-Adams, P. (2007) *J. Gen. Virol.* 88, 470–475
26. Wolk, B., Buchele, B., Moradpour, D., and Rice, C. M. (2008) *J. Virol.* 82, 10519–10531
27. Boulant, S., Douglas, M. W., Moody, L., Budkowska, A., Targett-Adams, P., and McLauchlan, J. (2008) *Traffic* 9, 1268–1282
28. Maillard, P., Lavergne, J. P., Siberil, S., Faure, G., Rouhiand, F., Petres, S., Teillaud, J. L., and Budkowska, A. (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 2430–2437
29. Boulant, S., Becchi, M., Penin, F., and Lavergne, J. P. (2003) *J. Biol. Chem.* 278, 45785–45792
30. Wakita, T., Pietschmann, T., Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., Murthy, K., Habermann, A., Krausslich, H. G., Mizokami, M., Bartenschlager, R., and Liang, T. J. (2005) *Nat. Med.* 11, 791–796
31. Maillard, P., Huby, T., Andreo, U., Moreau, M., Chapman, J., and Budkowska, A. (2006) *FASEB J.* 20, 735–737
32. Bartosch, B., Dubuisson, J., and Cosset, F. L. (2003) *J. Exp. Med.* 197, 633–642
33. Hsu, M., Zhang, J., Flint, M., Logvinoff, C., Cheng-Mayer, C., Rice, C. M., and McKeating, J. A. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 7271–7276
34. Drummer, H. E., Maerz, A., and Poumbourios, P. (2003) *FEBS Lett.* 546, 385–390
35. Blanchard, E., Belouzard, S., Goueslain, L., Wakita, T., Dubuisson, J., Wychowski, C., and Rouille, Y. (2006) *J. Virol.* 80, 6964–6972
36. Targett-Adams, P., and McLauchlan, J. (2005) *J. Gen. Virol.* 86, 3075–3080
37. Boulant, S., Targett-Adams, P., and McLauchlan, J. (2007) *J. Gen. Virol.* 88, 2204–2213
38. Luby-Phelps, K. (2000) *Int. Rev. Cytol.* 192, 189–221

39. Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., and Mann, M. (1996) *Anal. Chem.* 68, 850–858
40. Jordan, M. A., and Wilson, L. (1998) *Methods Enzymol.* 298, 252–276
41. Jordan, M. A., Thrower, D., and Wilson, L. (1992) *J. Cell Sci.* 102, 401–416
42. Mabit, H., Nakano, M. Y., Prank, U., Saam, B., Dohner, K., Sodeik, B., and Greber, U. F. (2002) *J. Virol.* 76, 9962–9971
43. Luduena, R. F. (1998) *Int. Rev. Cytol.* 178, 207–275
44. Miller, L. M., Menthena, A., Chatterjee, C., Verdier-Pinard, P., Novikoff, P. M., Horwitz, S. B., and Angeletti, R. H. (2008) *Biochemistry* 47, 7572–7582
45. Sullivan, K. F. (1988) *Annu. Rev. Cell Biol.* 4, 687–716
46. Meertens, L., Bertaux, C., and Dragic, T. (2006) *J. Virol.* 80, 11571–11578
47. Burlone, M., and Budkowska, A. (2009) *J. Gen. Virol.* 90, in press
48. Mamber, S. W., Mikkilineni, A. B., Pack, E. J., Rosser, M. P., Wong, H., Ueda, Y., and Forenza, S. (1995) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 274, 877–883
49. Ploubidou, A., Moreau, V., Ashman, K., Reckmann, I., Gonzalez, C., and Way, M. (2000) *EMBO J.* 19, 3932–3944
50. Elliott, G., and O'Hare, P. (1998) *J. Virol.* 72, 6448–6455
51. Kalicharran, K., and Dales, S. (1996) *Trends Microbiol.* 4, 264–269
52. Kaelin, K., Dezelee, S., Masse, M. J., Bras, F., and Flamand, A. (2000) *J. Virol.* 74, 474–482
53. Melki, R., Gaudin, Y., and Blondel, D. (1994) *Virology* 202, 339–347
54. Nejmeddine, M., Trugnan, G., Sapin, C., Kohli, E., Svensson, L., Lopez, S., and Cohen, J. (2000) *J. Virol.* 74, 3313–3320
55. Ogino, T., Iwama, M., Ohsawa, Y., and Mizumoto, K. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 311, 283–293
56. de Soultrait, V. R., Caumont, A., Durrens, P., Calmels, C., Parissi, V., Recordon, P., Bon, E., Desjobert, C., Tarrago-Litvak, L., and Fournier, M. (2002) *Biochim. Biophys. Acta* 1575, 40–48
57. de Mareuil, J., Carre, M., Barbier, P., Campbell, G. R., Lancelot, S., Opi, S., Esquieu, D., Watkins, J. D., Prevot, C., Braguer, D., Peyrot, V., and Loret, E. P. (2005) *Retrovirology* 2, 5
58. Boyko, V., Ferralli, J., and Heinlein, M. (2000) *Plant J.* 22, 315–325
59. Ruthel, G., Demmin, G. L., Kallstrom, G., Javid, M. P., Badie, S. S., Will, A. B., Nelle, T., Schokman, R., Nguyen, T. L., Carra, J. H., Bavari, S., and Aman, M. J. (2005) *J. Virol.* 79, 4709–4719
60. Schliwa, M., and Woehlke, G. (2003) *Nature* 422, 759–765
61. Gosert, R., Egger, D., Lohmann, V., Bartenschlager, R., Blum, H. E., Bienz, K., and Moradpour, D. (2003) *J. Virol.* 77, 5487–5492
62. Miyanari, Y., Atsuzawa, K., Usuda, N., Watashi, K., Hishiki, T., Zayas, M., Bartenschlager, R., Wakita, T., Hijikata, M., and Shimotohno, K. (2007) *Nat. Cell Biol.* 9, 1089–1097
63. Funk, A., Mhamdi, M., Lin, L., Will, H., and Sirma, H. (2004) *J. Virol.* 78, 8289–8300
64. Naranatt, P. P., Krishnan, H. H., Smith, M. S., and Chandran, B. (2005) *J. Virol.* 79, 1191–1206
65. Ploubidou, A., and Way, M. (2001) *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 97–105
66. Drukman, S., and Kavallaris, M. (2002) *Int. J. Oncol.* 21, 621–628

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Des avancées significatives ont été faites au cours des dernières années pour comprendre les étapes précoces de l'infection de la cellule par le VHC. Le développement du système de culture du VHC *in vitro* a permis de mettre en évidence le rôle de candidats récepteurs dans l'infection. Néanmoins, les étapes clés du cycle viral restent à élucider concernant l'attachement, les interactions moléculaires entre le virus et ses récepteurs, le processus d'internalisation menant à la fusion, ainsi que le transport de la nucléocapside virale vers le site de réplication.
Le VHC représente un nouveau modèle d'interaction virus-cellule dû au rôle essentiel des lipoprotéines dans l'infection et le cycle viral. L'entrée virale, la réplication, l'assemblage et la sécrétion du virus sont directement liés au métabolisme des lipides et des lipoprotéines. L'association des éléments viraux avec les gouttelettes lipidiques conditionne la morphogenèse des particules virales infectieuses et l'association avec les VLDL représente un événement essentiel pour la sécrétion du virus à partir de cellules infectées.

Dans notre but d'étudier les interactions du VHC avec la cellule hôte et les étapes précoces de l'infection, nous avons cherché à répondre aux questions suivantes :

- l'étroite relation entre le VHC et le métabolisme lipidique implique-t-il un rôle de la lipoprotéine lipase, une enzyme clé dans le métabolisme des lipoprotéines, dans l'entrée du VHC dans sa cellule cible et dans l'infection ?
- quel est le rôle du réseau de microtubules dans l'entrée du virus dans la cellule et dans le transport de ses composants, à des phases précoces de l'infection ?
- est-il possible de viser ces étapes clés du cycle viral pour prévenir ou atténuer l'infection ?

Si nous n'avons pas fourni des réponses définitives à toutes ces questions, l'ensemble de nos travaux apporte des éléments nouveaux sur la compréhension des étapes précoces du cycle viral du VHC, en particulier sur l'importance des lipoprotéines associées au virus et la nécessité pour le virus d'un réseau de microtubules fonctionnel et dynamique dans l'initiation d'une infection productive.

Il est connu depuis des années que le VHC circulant dans le sérum de patients présente un profil de densité très hétérogène. La majeure partie des particules virales est associée aux lipoprotéines : VLDL et LDL (Thomssen et al. 1992; Prince et al. 1996; Agnello et al. 1999; André et al. 2002). Les lipoprotéines ne sont pas simplement associées au VHC, mais elles

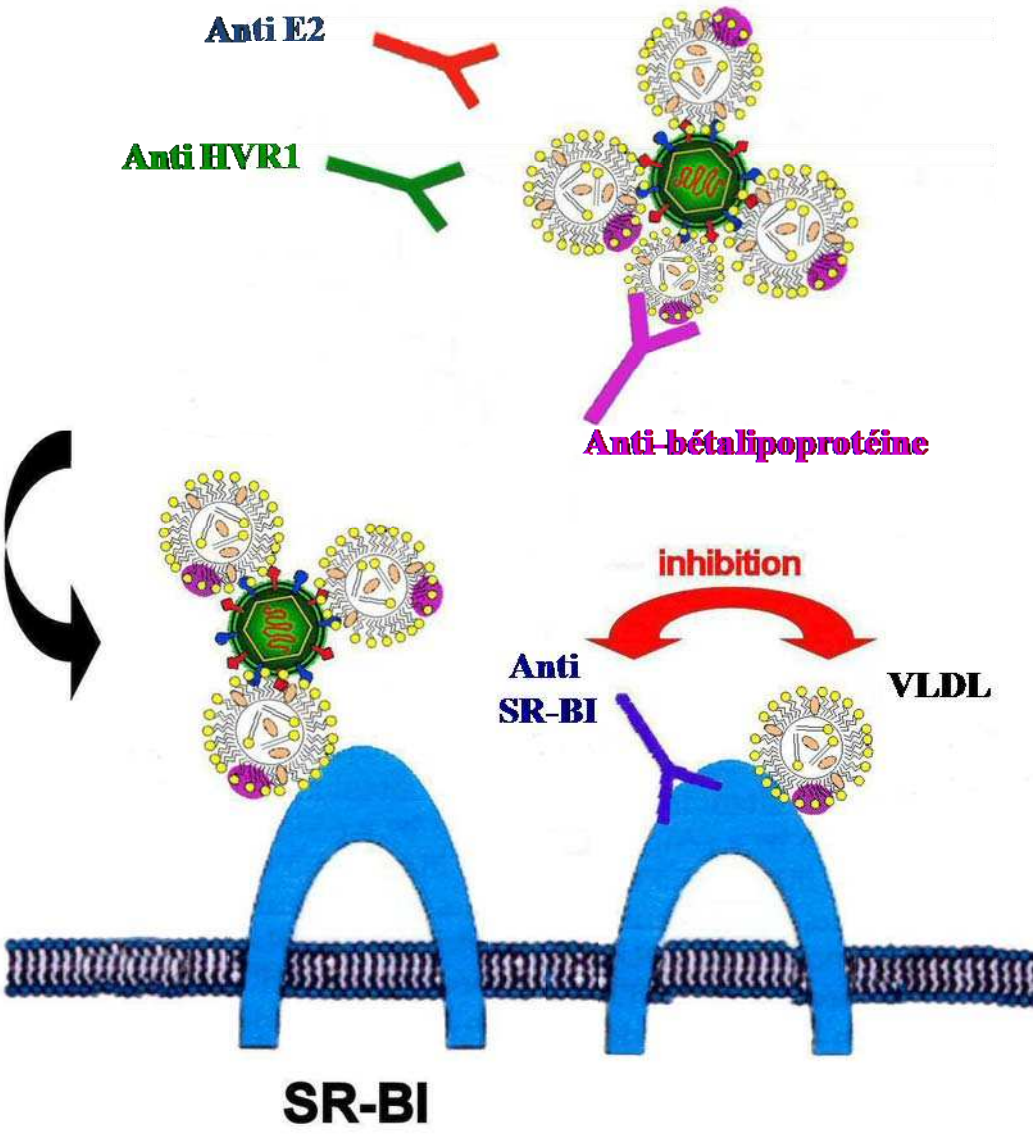


Figure 34 : Rôle de SR-B1 dans l'entrée du VHC naturel. D'après Maillard, *FASEB* (Maillard et al. 2006)

font partie intégrante des particules virales (Nielsen et al. 2006). En effet, en accord avec ces observations, il a été démontré plus récemment que l'assemblage et la sécrétion des particules virales suit la voie d'assemblage et de sécrétion des VLDL : la sécrétion du VHC est inhibée par des siRNA dirigés contre l'ApoB ou l'ApoE (Chang et al. 2007; Huang et al. 2007). La fraction virale provenant de sérum de patients et associée aux lipoprotéines est la plus infectieuse chez le chimpanzé (Bradley et al. 1991) et dans les systèmes de culture cellulaire *in vitro* (Agnello et al. 1999; Andre et al. 2002 et 2005). Notre équipe a montré que le VHC présent dans le sérum de patients interagit avec le récepteur SR-B1, conduisant à l'internalisation du virus, et que cette interaction fait intervenir les VLDL et LDL associées aux particules virales (Maillard et al. 2006). Ainsi, les lipoprotéines associées au virus favorisent l'entrée du VHC dans la cellule. Elles peuvent également masquer les épitopes essentiels en protégeant le virus contre des anticorps neutralisants et par conséquent participer aux mécanismes d'échappements du virus au contrôle immunologique de l'hôte (Figure 34). Ces observations sont en accord avec la coexistence d'anticorps anti-enveloppe avec le virus dans le sérum de patients infectés, rendant inefficace l'action neutralisante des anticorps et constituant un argument majeur pour expliquer le phénomène de persistance virale (von Hahn et al. 2007).

L'infection par le HCVcc produit *in vitro*, même si ce système ne correspond pas exactement à l'infection naturelle, dépend également des lipoprotéines. En effet, nous avons montré que les anticorps anti-β lipoprotéines inhibent l'infection par le HCVcc (Andreo et al. 2007). De plus, l'infectiosité du VHC est régulée par ApoC1 (Dreux et al. 2007). Le cholestérol ainsi que les sphingolipides associés au HCVcc sont critiques pour la maturation et le potentiel infectieux du virus (Aizaki et al. 2008). Toutes ces études soulignent le rôle crucial des lipoprotéines dans l'infection par le VHC.

Le rôle essentiel des lipoprotéines et de leurs récepteurs dans l'entrée du VHC dans la cellule nous a amenés à nous interroger sur le rôle possible de la LPL dans l'entrée du VHC dans la cellule. La LPL joue un rôle central dans le métabolisme des lipoprotéines. Cette enzyme exerce deux fonctions essentielles (Mead et al. 2002). Premièrement, la LPL hydrolyse les triglycérides dans les lipoprotéines riches en TG comme les chylomicrons et les VLDL, fournissant des acides gras libres pour les tissus périphériques, en particulier le tissu adipeux et les muscles. La lipolyse par la LPL est activée par ApoC2, alors qu'ApoC3 agit comme

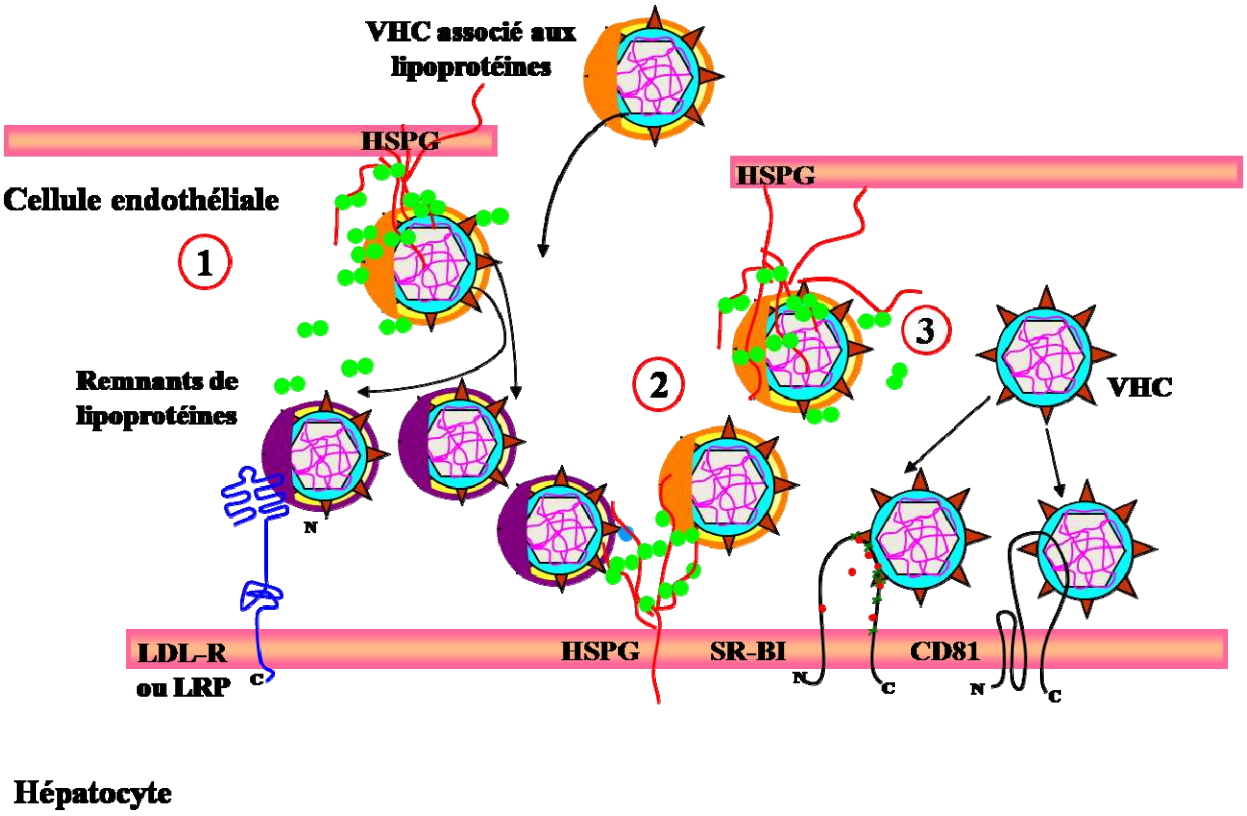


Figure 35 : mécanisme d'action de la LPL sur l'entrée du VHC

inhibiteur de ce processus (Mead et al. 2002). La LPL est synthétisée par le tissu adipeux ou les muscles et est majoritairement transférée à la surface luminale de l'endothélium vasculaire, où elle se lie aux TRL et les hydrolyse. Elle est fonctionnelle uniquement sous forme dimérique. Les dimères de LPL sont attachés aux HSPG ou à GPIHBP1 (Beigneux et al. 2009) localisés à la surface de l'endothélium vasculaire, un lieu clé de la lipolyse des TRL par la LPL.

Deuxièmement, la LPL cible les TRL vers le foie et médie leur clairance de la circulation en facilitant leur entrée *via* les récepteurs hépatiques (Mead et al. 2002; Zheng et al. 2006). Après lipolyse, les lipoprotéines diminuées en taille et enrichies en ApoE (« remnants » de VLDL) sont internalisées par les hépatocytes *via* les HSPG ou une autre voie dépendant des HSPG et du LDL-R ou du LRP, ou en l'absence de ces récepteurs par SR-B1 (Hu et al. 2008). En particulier, les chaînes de HSPG exprimées sur les hépatocytes présentent une plus grande affinité pour la LPL que les HSPG des autres tissus, ce qui explique que l'injection de la LPL chez la souris résulte en une clairance hépatique rapide des lipoprotéines (Zheng et al. 2006). En dehors de son activité enzymatique, la LPL augmente la clairance hépatique des chylomicrons et des VLDL par un mécanisme impliquant la formation d'un pont par la LPL dimérique entre les lipoprotéines et les HSPG présents à la surface cellulaire, ce qui correspond à une voie rapide de clairance hépatique.

Nos recherches ont apporté de nouvelles preuves du rôle indispensable des lipoprotéines associées aux particules virales dans la régulation de l'infectiosité du VHC. Tout d'abord, nous avons mis en évidence le rôle de la LPL comme médiateur de l'attachement et l'internalisation du virus naturel dans différents types cellulaires, dont la cellule hépatique (Andreo et al. 2007). Dans cette étude, nous avons démontré que le mécanisme d'action de la LPL sur le VHC naturel provenant du sérum de patient était analogue à la clairance hépatique des lipoprotéines sériques. La LPL se lie aux lipoprotéines associées au virus (son action est inhibée par des anticorps anti-β lipoprotéines) et aux HSPG présents à la surface cellulaire. Seule la LPL dimérique est apte à interagir avec le virus (des tests ELISA ont permis de différencier les formes monomériques et dimériques de la LPL). L'action de la LPL induit l'internalisation du virus dans la cellule, de façon analogue à l'internalisation des lipoprotéines, ceci grâce à la fonction de pontage de la LPL (Figure 35).
De façon surprenante, la LPL augmente l'association du virus avec la cellule (aussi bien le virus sérique que le HCVcc, même si cette augmentation pour ce dernier est beaucoup moins

importante) mais induit une inhibition de l'infection par le HCVcc *in vitro* (Andreo et al. 2007). La LPL affecte apparemment uniquement les stades très précoces de l'infection, car aucun effet inhibiteur n'est induit lorsqu'elle est ajoutée aux cellules 2h après infection.

L'ensemble de ces données suggérait un rôle inhibiteur de la LPL sur l'infection par le VHC (Andreo et al. 2007). Néanmoins, des différences peuvent exister entre le virus produit lors d'une infection naturelle *in vivo* et le HCVcc *in vitro*, en termes de composition des particules virales et de leur association aux lipoprotéines (Bukh 2006; Lindenbach et al. 2006). En effet, la cellule Huh7.5, capable de produire des particules virales en culture cellulaire, a un métabolisme lipidique défectif, ce qui pourrait influencer les propriétés des particules virales produites dans ces cellules. Dans les études suivantes nous avons donc posé la question de savoir si la LPL pouvait également inhiber l'infection par le virus produit dans des hépatocytes humains primaires ? Nous nous sommes intéressés au rôle de la LPL sur l'infection par le virus produit dans des hépatocytes humains primaires, transplantés chez des souris uPA-SCID, un des deux modèles *in vivo* le plus proche de l'infection naturelle actuellement disponible (cf chimpanzé). Dans cette deuxième étude (Walic et al. soumis), nous confirmons que la LPL agit comme un inhibiteur de l'infectiosité du VHC. Elle inhibe de façon significative l'infection des cellules Huh7.5 par les deux souches virales JFH-1 et J6/JFH-1 produites en culture cellulaire, et les mêmes souches du virus produites dans des hépatocytes humains primaires greffés chez les souris uPA-SCID.

La question suivante que nous nous sommes posés était de savoir quelle population du virus était sensible à l'action de la LPL. La composition des populations virales de densité différente reste à déterminer. Néanmoins, des techniques de centrifugation dans un gradient d'iodixanol ont été élaborées (Nielsen et al. 2007), permettant de séparer des populations virales de différentes densités, donc probablement associées aux différents types de lipoprotéines. L'ultracentrifugation des échantillons viraux en gradient d'iodixanol a révélé que les deux souches virales JFH-1 et J6/JFH-1 produites *in vitro* peuvent être séparées en deux populations : une de faible densité (en moyenne 1,02g/ml) et l'autre de plus forte densité (en moyenne 1,07g/ml). Ces deux populations virales colocalisent avec ApoB et le cholestérol dans les fractions d'intérêt et leur densité relativement faible confirme leur association avec les lipoprotéines. Ces observations sont en accord avec la nécessité pour le virus d'utiliser ces composants pour sa structure et sa sécrétion.

En accord avec les observations précédentes *in vivo* (Bradley et al. 1991) et *in vitro* (Agnello et al. 1999; André et al. 2002), nous avons constaté que la population de plus faible densité du virus produit *in vitro* est également plus infectieuse que la population plus dense. Des résultats similaires ont été obtenus pour les mêmes souches de HCVcc produit dans le modèle de souris uPA-SCID. Les virus produits *in vitro* ont été également séparés en deux populations : la population légère étant toujours beaucoup plus infectieuse (100-1000 fois) que la population de densité plus élevée. De plus, une différence a été observée, uniquement pour la souche JFH-1, concernant la densité de la fraction majeure du virus produit *in vitro* et *in vivo* : 1,086 versus 1,045. La souche J6/JFH-1 est différente de la souche JFH-1 du point de vue des protéines structurales (bien que les deux souches soient de génotype 2a). En effet, des différences de densités sont observées entre deux souches pour la population plus lourde. Les différences dans les séquences d'aa des glycoprotéines d'enveloppe pourraient influencer leur interaction avec les lipoprotéines, et par conséquent les propriétés physicochimiques du HCVcc.

Nous avons constaté que la LPL inhibe l'infection des cellules par ces deux populations virales obtenues à partir des virus produits aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Ces observations suggèrent que la composition en lipides associés aux particules virales n'influence pas significativement l'effet de l'enzyme sur l'infectiosité du VHC. En effet, *in vivo* la LPL est capable d'augmenter l'entrée cellulaire des différentes lipoprotéines contenant l'ApoB telles que les LDL, les VLDL, les chylomicrons et leur « remnants » (Zheng et al. 2006).

Du fait que la LPL présente deux fonctions biologiques, son effet sur l'infection par le VHC pourrait être dû soit à son activité enzymatique (et donc à l'induction d'un changement dans la composition des lipoprotéines associées au virus), soit à la capacité d'introduire le virus dans la cellule sur la voie abortive de l'infection. Effectivement, il a été montré que la LPL de Pseudomonas spp. exerçait une activité virolytique sur le VHC provenant du sérum de patient, provoquant sa dégradation (Thomssen 2002). Dans notre étude précédente, nous avons confirmé cette observation concernant la LPL de Pseudomonas spp. (Andreo et al. 2007), mais avons également montré que cet effet virolytique n'était pas retrouvé avec la LPL bovine, homologue à la LPL humaine et souvent utilisée pour étudier les propriétés et fonctions de la LPL humaine. L'hypothèse d'une dégradation des particules virales par la LPL a été également exclue dans notre deuxième étude (Walic et al. soumis) : le traitement du virus avec la LPL soluble (non fixée sur les cellules) aux mêmes concentrations et sur une

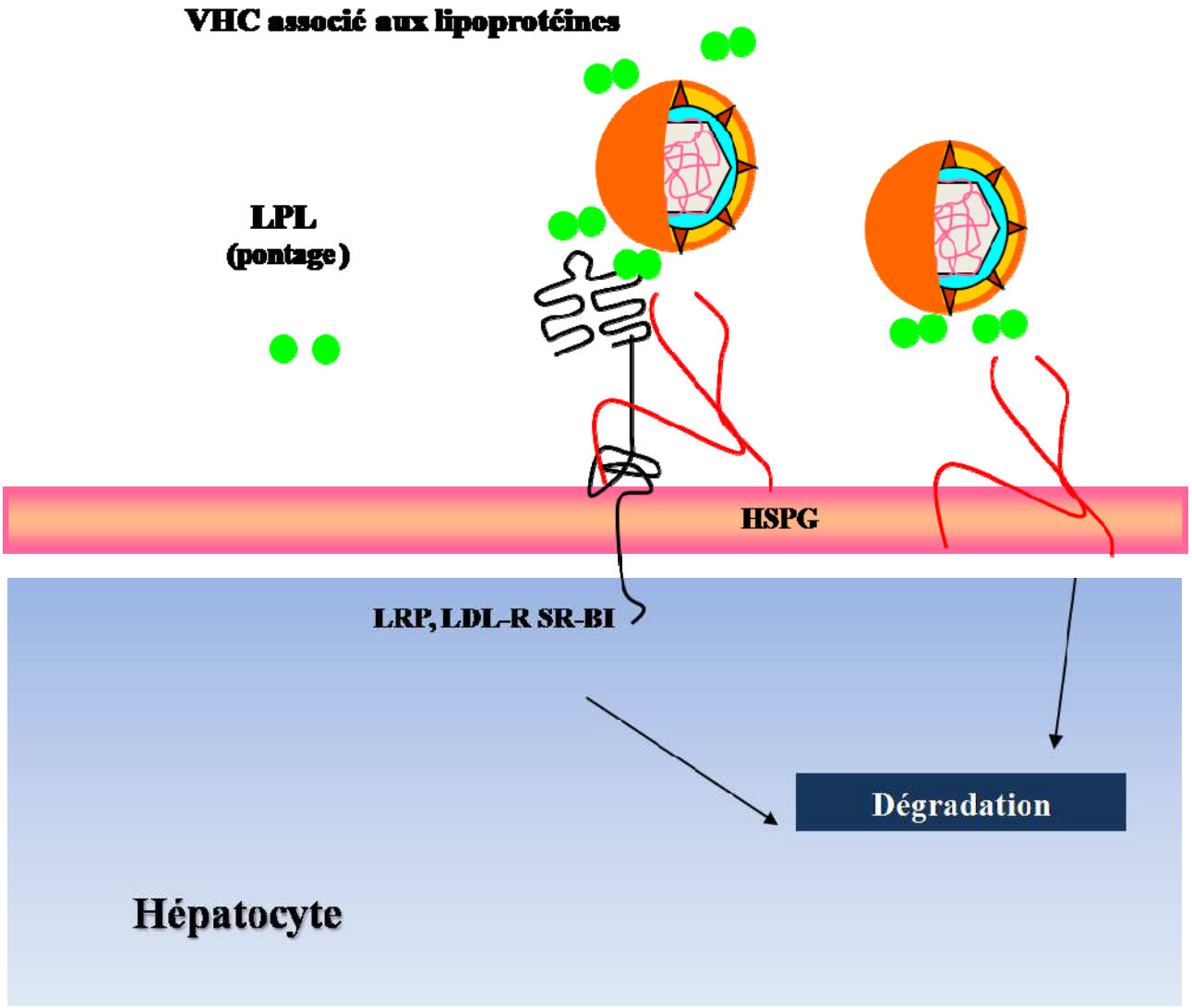


Figure 36 : Modèle d'entrée du VHC dans la cellule médiée par la LPL

durée identique aux conditions utilisées pour notre approche cellulaire n'a pas induit de changement significatif, à la fois dans la densité et dans la quantité d'ARN viral contenu dans les différentes fractions virales. Dans cette dernière étude, nous avons également démontré que l'effet inhibiteur de la LPL sur l'infectiosité du VHC, produit aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, n'était pas sensible à l'action de la THL, inhibiteur de l'activité enzymatique de la LPL. Le dosage d'activité enzymatique de la LPL est en cours et il permettra de confirmer cette observation. Les différences observées dans cette étude comparativement à notre étude précédente pourrait être dûes à l'utilisation des différentes préparations commerciales d'inhibiteur enzymatique (THL), ou à une action différente de la LPL sur l'internalisation du virus sérique et du HCVcc. Les travaux en cours devraient nous aider à expliquer ces différences.

Nos observations vont donc dans le sens d'un possible effet modulateur de la LPL sur l'infectiosité du VHC *in vivo*. En nous basant sur nos données actuelles, nous pensons que la LPL pourrait stimuler une voie non- productive d'entrée du virus dans la cellule, conduisant le VHC à la dégradation (Figure 36). Dans ce mécanisme (infection abortive), les complexes virus-LPL pourraient être internalisés par une voie de dégradation des lipoprotéines, indépendante des récepteurs hépatiques pour le VHC. En suivant la voie LPL-dépendante, les « remnants » des lipoprotéines internalisées fusionneraient avec les lysosomes, activant la protéolyse et la lipolyse, ce qui produirait du cholestérol utilisé ensuite par les VLDL nouvellement synthétisées ou sécrété par la bile. Notre équipe étudie actuellement cette hypothèse par des techniques de microscopie électronique. L'étude du rôle de la LPL dans l'infection d'hépatocytes humains en culture primaire par le virus naturel provenant du sérum de patients infectés ou par HCVcc pourrait également se révéler intéressante. L'étude de l'impact de la réduction d'expression des différents récepteurs potentiellement impliqués (LDL-R, LRP, etc) à l'aide de siRNA spécifiques nous semble aussi une voie d'intérêt.

Récemment, en collaboration avec d'autres groupes, notre équipe a montré que la LPL pouvait jouer un rôle dans les étapes précoces d'infection des cellules par d'autres virus hépatotropes tels que le VHB (Deng et al. 2007). De plus, du fait de sa capacité d'interagir avec différents types cellulaires, la LPL pourrait jouer un rôle dans le mécanisme d'évasion virale, en facilitant l'entrée du virus dans des cellules non sensibles à l'infection, conférant ainsi au VHC une protection face à la réponse immune de l'hôte et assurant au virus sa survie

et son transport aux cellules permissives. Ces mécanismes pourraient favoriser l'évolution vers une infection persistante.

Les travaux effectués dans notre laboratoire permettent par conséquent de mieux définir les mécanismes d'entrée du VHC dans la cellule et les étapes précoces de l'infection, et soulignent le rôle essentiel des lipoprotéines dans ces mécanismes. Ces observations, liées à celles à d'autres équipes, permettent de proposer un mécanisme d'entrée du VHC. La liaison du virus à la surface de l'hépatocyte impliquerait en effet les lipoprotéines associées au VHC. Celles-ci vont se lier au LDL-R et/ou aux HSPG, ou encore directement à SR-B1. A ce stade de l'infection, la LPL pourrait intervenir comme régulateur de l'infection (Budkowska 2009). L'interaction du virus avec le complexe SR-B1/CD81 va déclencher une cascade de signalisation nécessaire à l'entrée virale (Brazzoli et al. 2008) et à l'initiation de l'infection : après transfert au niveau des jonctions serrées et son interaction avec les récepteurs comme CLDN-1 et occludine, le VHC est internalisé par voie clathrine-dépendante. Ensuite, les glycoprotéines d'enveloppe virale participent à la fusion dans le compartiment endosomal (l'ApoB serait également impliquée). La nucléocapside virale est alors libérée dans le cytoplasme.

Dans le contexte de l'entrée virale, nos résultats suggèrent également que le VHC exploite le réseau de microtubules dans les étapes précoces de l'infection : premièrement avant la fusion, et ensuite dans le transport des nucléocapsides dans les étapes post-fusion (Roohvand et al. 2009). En effet, en utilisant le modèle JFH-1 ainsi que des molécules affectant la dynamique des principaux composants du cytosquelette, nous apportons la preuve qu'un réseau de microtubules intact et dynamique joue un rôle clé dans ces étapes du cycle viral. La vinblastine, qui inhibe la polymérisation de la tubuline, le nocodazole inhibant la polymérisation des microtubules, et le paclitaxel qui les stabilise, inhibent les étapes précoces de l'infection. La cytochalasine D, un inhibiteur de la polymérisation de l'actine, visant donc le transport cellulaire actine-dépendant, n'a quant à elle aucun effet sur l'initiation de l'infection dans notre système.

En utilisant des pseudoparticules HCVpp comme modèles des étapes précoces de l'entrée virale, nous avons montré que les étapes d'internalisation du virus, depuis son attachement à la surface de la cellule jusqu'à la fusion des glycoprotéines d'enveloppe dans un compartiment endosomal, dépendent de l'intégrité du réseau de microtubules.

Nos études sur le modèle HCVcc ont également montré qu'un réseau de microtubules intact et dynamique est requis lors des évènements plus tardifs du cycle viral du VHC, après libération de la nucléocapside virale et lors de son transport. L'effet de ces réactifs, pour les concentrations utilisées, suggère que le transport précoce du virus dépend de l'instabilité dynamique et/ou du « treadmilling » des microtubules. De plus, nos résultats suggèrent que ces étapes précoces de l'infection pourraient impliquer une interaction de la protéine de capside du VHC avec les microtubules. En effet, nos observations ont prouvé l'existence d'une interaction directe entre la tubuline α/β avec le domaine D1 de la protéine de capside du VHC. Ces observations ont été confirmées par des études *in vitro*, qui ont permis de mettre en évidence l'interaction directe de la protéine de capside avec la tubuline par les techniques de BIA-core et sa capacité d'augmenter de façon significative la polymérisation des microtubules *in vitro* (Roohvand et al. 2009).

Plusieurs virus utilisent le réseau de microtubules pour le transport de leurs composants, l'établissement de l'infection et/ou la sécrétion de particules virales à partir de cellules infectées. Néanmoins, le transport de molécules le long des microtubules fait en général intervenir des protéines motrices, comme la kinésine ou la dynéine. Ces protéines utilisent de l'énergie provenant de l'hydrolyse de l'ATP pour qu'il y ait mouvement du cargo, mais ce processus est indépendant des cinétiques de polymérisation et dépolymérisation des microtubules. Un autre mécanisme de transport sur les microtubules est le « treadmilling » et implique la polymérisation des microtubules à leur extrémité positive et leur dépolymérisation à l'extrémité négative, après action de la katénine cellulaire (cf Figure 28). Comme la protéine de capside augmente de façon significative la polymérisation des microtubules *in vitro*, le transport intracellulaire de la protéine de capside virale pourrait donc être médié par des mécanismes liés à la polymérisation de la tubuline. Cette propriété de la protéine de capside constituerait un nouveau paradigme d'interaction virus-cellule en plus de la dépendance du cycle viral du VHC au métabolisme des lipides et lipoprotéines de l'hôte.

A l'heure actuelle, seulement trois protéines virales ont été identifiées comme interagissant directement avec la tubuline : la protéine Tat du VIH (de Mareuil et al. 2005), une protéine du virus de la Mosaïque du Tabac (Boyko et al. 2000) et la protéine de matrice VP40 du virus Ebola (Ruthel et al. 2005). Cependant, les mécanismes exacts et le rôle de ces interactions dans le transport de ces trois composants viraux restent à élucider.

Il a été déjà démontré que les autres étapes du cycle du VHC dépendent des éléments du cytosquelette cellulaire. La réplication de l'ARN du VHC a lieu dans le cytoplasme au niveau de complexes de réplication associés à des membranes cellulaires, appelées « membranous web ». Les composants du cytosquelette permettent le mouvement de ces complexes de réplication (Wolk, et al. 2008). La morphogénèse et la sécrétion du VHC exigent également la présence d'un réseau de microtubules fonctionnel (Boulant et al. 2008). Dans le processus de morphogenèse, la protéine de capside joue un rôle essentiel car elle recrute probablement des protéines non-structurales et les complexes de réplication au niveau des membranes associées aux LD. La protéine de capside se lie à la LD jusqu'à l'entourer progressivement, ce qui permet leur transport *via* les microtubules selon un mécanisme dynéine-dépendant (Boulant et al. 2008), jusqu'au niveau périnucléaire, où la morphogénèse du virus a lieu (Miyanari et al. 2007).

Nos études ont apporté un élément nouveau, en montrant que le réseau de microtubules intact et dynamique joue un rôle clé dans l'internalisation du virus conduisant à une infection productive. Bien que ce point requiert de plus amples travaux, nous pensons que la protéine de capside pourrait exploiter le réseau de microtubules et utiliser les mécanismes d'instabilité dynamique et/ou de treadmilling, de façon à faciliter le transport de la nucléocapside virale dans les cellules infectées. Une autre fonction possible de la protéine de capside pourrait être, par son rôle de cargo, de réguler les mouvements kinésine ou dynéine-dépendants. En effet, l'un des mécanismes proposés dans le transport bidirectionnel évoque le cargo comme responsable du changement de direction sur les microtubules (Welte 2004). La liaison de cette protéine cargo à la tubuline et l'augmentation de la polymérisation des microtubules pourraient altérer les mouvements basés sur la kinésine ou la dynéine. Cependant, ce mécanisme de régulation reste à élucider.

Notre équipe tente actuellement de caractériser le site de liaison de la tubuline et celui de la capside. Dans l'étude du site de liaison de la protéine de capside, l'analyse de différents fragments peptidiques de la capside est en cours par les techniques de BIA-core (SPR) et le test de polymérisation *in vitro*. Le fragment de la protéine de capside interagissant avec la tubuline pourrait être utilisé dans des essais d'inhibition de l'infection *in vitro.*

Mes collègues étudient également l'interaction de la protéine de capside avec la tubuline dans des cellules en culture, pour rechercher une colocalisation éventuelle de ces deux composants lors des différentes phases de l'infection. Ils étudient ainsi les éventuelles modifications post-traductionnelles de la tubuline et/ou la stabilisation des microtubules que pourrait induire l'infection par le VHC. La cristallisation du complexe protéine de capside/tubuline est envisageable afin de déterminer la structure de la protéine de capside.

CONCLUSION GENERALE

Nos études montrent que la lipoprotéine lipase, une enzyme clé du métabolisme des lipoprotéines, apportée comme ligand exogène, agit comme un inhibiteur naturel de l'infection de la cellule par le VHC. La LPL est capable d'inhiber de façon efficace l'infection par les virus produits *in vitro* dans les cellules en culture et par les mêmes souches virales produites dans les hépatocytes primaires greffés chez les souris humanisées.

Nos études suggèrent que l'action de la LPL est indépendante de son activité enzymatique, mais implique un mécanisme de pontage, similaire à celui de la clearance hépatique des lipoprotéines de la circulation. La LPL médie donc probablement une voie alternative d'entrée du VHC dans la cellule, conduisant à une infection abortive.

Nos résultats constituent une ouverture dans l'étude des mécanismes de l'entrée du VHC et suggèrent ainsi que la LPL pourrait moduler l'infectiosité du VHC *in vivo*.

L'augmentation de l'expression de la LPL peut être effectuée au moyen de vecteurs adénoviraux, et cette stratégie a déjà été évoquée pour le traitement des déficiences en LPL (Stroes et al. 2008). Elle pourrait donc être potentiellement appliquée pour le traitement de l'infection par le VHC. Des études plus approfondies sur le modèle de souris humanisées pourraient apporter les informations nécessaires pour appuyer cette hypothèse.

Le message le plus important de cette étude est que les composants lipoprotéiques associés aux particules virales pourraient constituer de nouvelles cibles pour les stratégies antivirales.

Nos études des mécanismes d'entrée virale montrent également le rôle essentiel des microtubules dans l'initiation de l'infection par le VHC, ainsi que dans les étapes précèdant et suivant la fusion.

De plus, nos résultats montrent une nouvelle propriété de la protéine de capside : sa capacité d'interagir avec les chaînes α et β de la tubuline, induisant et augmentant ainsi la

polymérisation des microtubules d'une façon plus efficace que les autres protéines virales connues, telle que la protéine Tat de VIH.

Nos observations suggèrent que le VHC pourrait exploiter le réseau de microtubules pour le transport de la protéine de la nucléocapside virale, par des mécanismes polymérisation-dépendants, à certaines étapes du cycle viral. Une telle interaction pourrait jouer un rôle dans les étapes précoces de l'infection (ce que suggèrent nos études), mais également à des étapes tardives du cycle viral, lors de la morphogenèse et la sécrétion du VHC.

Améliorer nos connaissances des conséquences de l'interaction protéine de capside/microtubules pourrait faciliter le développement de nouvelles approches thérapeutiques ciblant l'inhibition de l'infection. Des molécules modifiant la dynamique des microtubules sont en effet déjà utilisées lors des traitements contre le cancer.

BIBLIOGRAPHIE

Abraham, R., B. Ramakrishna, et al. (2009). "Clinicopathological features and genotype distribution in patients with hepatitis C virus chronic liver disease." Indian J Gastroenterol **28**(2): 53-8.

Agnello, V., G. Abel, et al. (1999). "Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells *via* low density lipoprotein receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(22): 12766-71.

Aizaki, H., K. Morikawa, et al. (2008). "Critical role of virion-associated cholesterol and sphingolipid in hepatitis C virus infection." J Virol **82**(12): 5715-24.

Alonzi, T., C. Mancone, et al. (2008). "Elucidation of lipoprotein particles structure by proteomic analysis." Expert Rev Proteomics **5**(1): 91-104.

Andre, P., F. Komurian-Pradel, et al. (2002). "Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles." J Virol **76**(14): 6919-28.

Andre, P. and V. Lotteau (2008). "Hepatitis C virus assembly: when fat makes it easier." J Hepatol **49**(1): 153-5.

Andre, P., G. Perlemuter, et al. (2005). "Hepatitis C virus particles and lipoprotein metabolism." Semin Liver Dis **25**(1): 93-104.

Andreo, U., P. Maillard, et al. (2007). "Lipoprotein lipase mediates hepatitis C virus (HCV) cell entry and inhibits HCV infection." Cell Microbiol **9**(10): 2445-56.

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

Barth, H., C. Schafer, et al. (2003). "Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate." J Biol Chem **278**(42): 41003-12.

Bartosch, B., J. Dubuisson, et al. (2003). "Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes." J Exp Med **197**(5): 633-42.

Beames, B., D. Chavez, et al. (2000). "Development of a primary tamarin hepatocyte culture system for GB virus-B: a surrogate model for hepatitis C virus." J Virol **74**(24): 11764-72.

Beigneux, A. P., B. S. Davies, et al. (2009). "GPIHBP1, a GPI-anchored protein required for the lipolytic processing of triglyceride-rich lipoproteins." J Lipid Res **50 Suppl**: S57-62.

Blanchard, E., S. Belouzard, et al. (2006). "Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis." J Virol **80**(14): 6964-72.

Blasiole, D. A., R. A. Davis, et al. (2007). "The physiological and molecular regulation of lipoprotein assembly and secretion." Mol Biosyst **3**(9): 608-19.

Botham, K. M. (2008). "Oxidation of chylomicron remnants and vascular dysfunction." Atheroscler Suppl **9**(2): 57-61.

Boulant, S., M. W. Douglas, et al. (2008). "Hepatitis C virus core protein induces lipid droplet redistribution in a microtubule- and dynein-dependent manner." Traffic **9**(8): 1268-82.

Boyko, V., J. Ferralli, et al. (2000). "Function of microtubules in intercellular transport of plant virus RNA." Nat Cell Biol **2**(11): 826-32.

Bradley, D., K. McCaustland, et al. (1991). "Hepatitis C virus: buoyant density of the factor VIII-derived isolate in sucrose." J Med Virol **34**(3): 206-8.

Branch, A. D., D. D. Stump, et al. (2005). "The hepatitis C virus alternate reading frame (ARF) and its family of novel products: the alternate reading frame protein/F-protein, the double-frameshift protein, and others." Semin Liver Dis **25**(1): 105-17.

Brazzoli, M., A. Bianchi, et al. (2008). "CD81 is a central regulator of cellular events required for hepatitis C virus infection of human hepatocytes." J Virol **82**(17): 8316-29.

Brazzoli, M., A. Helenius, et al. (2005). "Folding and dimerization of hepatitis C virus E1 and E2 glycoproteins in stably transfected CHO cells." Virology **332**(1): 438-53.

Brohm, C., E. Steinmann, et al. (2009). "Characterization of determinants important for hepatitis C virus p7 function in morphogenesis by using trans-complementation." J Virol **83**(22): 11682-93.
Buck, M. (2008). "Direct infection and replication of naturally occurring hepatitis C virus genotypes 1, 2, 3 and 4 in normal human hepatocyte cultures." PLoS One **3**(7): e2660.
Budkowska, A. (2009). "Mechanism of cell infection with hepatitis C virus (HCV)--a new paradigm in virus-cell interaction." Pol J Microbiol **58**(2): 93-8.
Bukh, J., R. H. Miller, et al. (1995). "Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes." Semin Liver Dis **15**(1): 41-63.
Bukh, J. and R. H. Purcell (2006). "A milestone for hepatitis C virus research: a virus generated in cell culture is fully viable *in vivo*." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(10): 3500-1.
Chan, D. C., M. M. Chen, et al. (2008). "An ABC of apolipoprotein C-III: a clinically useful new cardiovascular risk factor?" Int J Clin Pract **62**(5): 799-809.
Chang, K. S., J. Jiang, et al. (2007). "Human apolipoprotein e is required for infectivity and production of hepatitis C virus in cell culture." J Virol **81**(24): 13783-93.
Chang, S. F., B. Reich, et al. (1998). "Detailed characterization of the binding site of the lipoprotein lipase-specific monoclonal antibody 5D2." J Lipid Res **39**(12): 2350-9.
Chevaliez, S. and J. M. Pawlotsky (2009). "How to use virological tools for optimal management of chronic hepatitis C." Liver Int **29 Suppl 1**: 9-14.
Choo, Q. L., G. Kuo, et al. (1989). "Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome." Science **244**(4902): 359-62.
Cocquerel, L., C. Voisset, et al. (2006). "Hepatitis C virus entry: potential receptors and their biological functions." J Gen Virol **87**(Pt 5): 1075-84.
Cormier, E. G., R. J. Durso, et al. (2004). "L-SIGN (CD209L) and DC-SIGN (CD209) mediate transinfection of liver cells by hepatitis C virus." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(39): 14067-72.
Cormier, E. G., F. Tsamis, et al. (2004). "CD81 is an entry coreceptor for hepatitis C virus." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(19): 7270-4.
de Bruijne, J., C. J. Weegink, et al. (2009). "New developments in the antiviral treatment of hepatitis C." Vox Sang **97**(1): 1-12.
de Mareuil, J., M. Carre, et al. (2005). "HIV-1 Tat protein enhances microtubule polymerization." Retrovirology **2**: 5.
De Vos, R., C. Verslype, et al. (2002). "Ultrastructural visualization of hepatitis C virus components in human and primate liver biopsies." J Hepatol **37**(3): 370-9.
Deng, Q., J. W. Zhai, et al. (2007). "Identification and characterization of peptides that interact with hepatitis B virus *via* the putative receptor binding site." J Virol **81**(8): 4244-54.
Diaz, O., M. Cubero, et al. (2008). "Transmission of low-density hepatitis C viral particles during sexually transmitted acute resolving infection." J Med Virol **80**(2): 242-6.
Dohner, K., C. H. Nagel, et al. (2005). "Viral stop-and-go along microtubules: taking a ride with dynein and kinesins." Trends Microbiol **13**(7): 320-7.
Dreux, M., B. Boson, et al. (2007). "The exchangeable apolipoprotein ApoC-I promotes membrane fusion of hepatitis C virus." J Biol Chem **282**(44): 32357-69.
Dreux, M., V. L. Dao Thi, et al. (2009). "Receptor complementation and mutagenesis reveal SR-BI as an essential HCV entry factor and functionally imply its intra- and extra-cellular domains." PLoS Pathog **5**(2): e1000310.
Dubuisson, J. (2007). "Hepatitis C virus proteins." World J Gastroenterol **13**(17): 2406-15.
Dubuisson, J., F. Helle, et al. (2008). "Early steps of the hepatitis C virus life cycle." Cell Microbiol **10**(4): 821-7.

Evans, M. J., C. M. Rice, et al. (2004). "Phosphorylation of hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates its protein interactions and viral RNA replication." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(35): 13038-43.
Evans, M. J., T. von Hahn, et al. (2007). "Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry." Nature **446**(7137): 801-5.
Falcon, V., N. Acosta-Rivero, et al. (2003). "Nuclear localization of nucleocapsid-like particles and HCV core protein in hepatocytes of a chronically HCV-infected patient." Biochem Biophys Res Commun **310**(1): 54-8.
Fernandez-Borja, M., D. Bellido, et al. (1996). "Lipoprotein lipase-mediated uptake of lipoprotein in human fibroblasts: evidence for an LDL receptor-independent internalization pathway." J Lipid Res **37**(3): 464-81.
Flint, M., T. von Hahn, et al. (2006). "Diverse CD81 proteins support hepatitis C virus infection." J Virol **80**(22): 11331-42.
Flisiak, R., A. Horban, et al. (2008). "The cyclophilin inhibitor Debio-025 shows potent anti-hepatitis C effect in patients coinfected with hepatitis C and human immunodeficiency virus." Hepatology **47**(3): 817-26.
Forns, X. and J. Costa (2006). "HCV virological assessment." J Hepatol **44**(1 Suppl): S35-9.
Funk, A., M. Mhamdi, et al. (2004). "Itinerary of hepatitis B viruses: delineation of restriction points critical for infectious entry." J Virol **78**(15): 8289-300.
Gastaminza, P., G. Cheng, et al. (2008). "Cellular determinants of hepatitis C virus assembly, maturation, degradation, and secretion." J Virol **82**(5): 2120-9.
Goldberg, I. J., R. H. Eckel, et al. (2009). "Regulation of fatty acid uptake into tissues: lipoprotein lipase- and CD36-mediated pathways." J Lipid Res **50 Suppl**: S86-90.
Greber, U. F. and M. Way (2006). "A superhighway to virus infection." Cell **124**(4): 741-54.
Haid, S., T. Pietschmann, et al. (2009). "Low pH-dependent hepatitis C virus membrane fusion depends on E2 integrity, target lipid composition, and density of virus particles." J Biol Chem **284**(26): 17657-67.
Helle, F. and J. Dubuisson (2008). "Hepatitis C virus entry into host cells." Cell Mol Life Sci **65**(1): 100-12.
Henry, T., J. P. Gorvel, et al. (2006). "Molecular motors hijacking by intracellular pathogens." Cell Microbiol **8**(1): 23-32.
Hijikata, M., Y. K. Shimizu, et al. (1993). "Equilibrium centrifugation studies of hepatitis C virus: evidence for circulating immune complexes." J Virol **67**(4): 1953-8.
Houghton, M. (2009). "Discovery of the hepatitis C virus." Liver Int **29 Suppl 1**: 82-8.
Hu, L., C. C. van der Hoogt, et al. (2008). "The hepatic uptake of VLDL in lrp-ldlr-/-vldlr-/- mice is regulated by LPL activity and involves proteoglycans and SR-BI." J Lipid Res **49**(7): 1553-61.
Huang, H., F. Sun, et al. (2007). "Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(14): 5848-53.
Icard, V., O. Diaz, et al. (2009). "Secretion of hepatitis C virus envelope glycoproteins depends on assembly of apolipoprotein B positive lipoproteins." PLoS One **4**(1): e4233.
Imbert-Bismut, F., V. Ratziu, et al. (2001). "Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection: a prospective study." Lancet **357**(9262): 1069-75.
Ishii, S. and M. J. Koziel (2008). "Immune responses during acute and chronic infection with hepatitis C virus." Clin Immunol **128**(2): 133-47.
Ito, T., J. Mukaigawa, et al. (1996). "Cultivation of hepatitis C virus in primary hepatocyte culture from patients with chronic hepatitis C results in release of high titre infectious virus." J Gen Virol **77 (Pt 5)**: 1043-54.

Ji, Y., B. Jian, et al. (1997). "Scavenger receptor BI promotes high density lipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux." J Biol Chem **272**(34): 20982-5.
Jong, M. C., M. H. Hofker, et al. (1999). "Role of ApoCs in lipoprotein metabolism: functional differences between ApoC1, ApoC2, and ApoC3." Arterioscler Thromb Vasc Biol **19**(3): 472-84.
Kaito, M., E. C. Gabazza, et al. (2006). "Immune complex of hepatitis C virus particles detected by immunogold electron microscopy." J Gastroenterol **41**(8): 807-8.
Kapadia, S. B., H. Barth, et al. (2007). "Initiation of hepatitis C virus infection is dependent on cholesterol and cooperativity between CD81 and scavenger receptor B type I." J Virol **81**(1): 374-83.
Kapadia, S. B. and F. V. Chisari (2005). "Hepatitis C virus RNA replication is regulated by host geranylgeranylation and fatty acids." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(7): 2561-6.
Kittlesen, D. J., K. A. Chianese-Bullock, et al. (2000). "Interaction between complement receptor gC1qR and hepatitis C virus core protein inhibits T-lymphocyte proliferation." J Clin Invest **106**(10): 1239-49.
Kobayashi, J., A. Nohara, et al. (2007). "Serum lipoprotein lipase mass: clinical significance of its measurement." Clin Chim Acta **378**(1-2): 7-12.
Koutsoudakis, G., A. Kaul, et al. (2006). "Characterization of the early steps of hepatitis C virus infection by using luciferase reporter viruses." J Virol **80**(11): 5308-20.
Kremsdorf, D. and N. Brezillon (2007). "New animal models for hepatitis C viral infection and pathogenesis studies." World J Gastroenterol **13**(17): 2427-35.
Kueh, H. Y. and T. J. Mitchison (2009). "Structural plasticity in actin and tubulin polymer dynamics." Science **325**(5943): 960-3.
Lai, C. K., K. S. Jeng, et al. (2008). "Association of hepatitis C virus replication complexes with microtubules and actin filaments is dependent on the interaction of NS3 and NS5A." J Virol **82**(17): 8838-48.
Large, M. K., D. J. Kittlesen, et al. (1999). "Suppression of host immune response by the core protein of hepatitis C virus: possible implications for hepatitis C virus persistence." J Immunol **162**(2): 931-8.
Lauer, G. M. and B. D. Walker (2001). "Hepatitis C virus infection." N Engl J Med **345**(1): 41-52.
Lee, C. H., Y. H. Choi, et al. (2001). "Hepatitis C virus core protein inhibits interleukin 12 and nitric oxide production from activated macrophages." Virology **279**(1): 271-9.
Leopold, P. L. and K. K. Pfister (2006). "Viral strategies for intracellular trafficking: motors and microtubules." Traffic **7**(5): 516-23.
Lewis, G. F. and D. J. Rader (2005). "New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport." Circ Res **96**(12): 1221-32.
Liang, Y., T. Shilagard, et al. (2009). "Visualizing hepatitis C virus infections in human liver by two-photon microscopy." Gastroenterology **137**(4): 1448-58.
Lindenbach, B. D., P. Meuleman, et al. (2006). "Cell culture-grown hepatitis C virus is infectious *in vivo* and can be recultured *in vitro*." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(10): 3805-9.
Liu, S., W. Yang, et al. (2009). "Tight junction proteins claudin-1 and occludin control hepatitis C virus entry and are downregulated during infection to prevent superinfection." J Virol **83**(4): 2011-4.
Lo, S. Y., M. J. Selby, et al. (1996). "Interaction between hepatitis C virus core protein and E1 envelope protein." J Virol **70**(8): 5177-82.
Lohmann, V., F. Korner, et al. (1999). "Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line." Science **285**(5424): 110-3.

Lookene, A., N. Skottova, et al. (1994). "Interactions of lipoprotein lipase with the active-site inhibitor tetrahydrolipstatin (Orlistat)." Eur J Biochem **222**(2): 395-403.
Lookene, A., L. Zhang, et al. (2004). "Rapid subunit exchange in dimeric lipoprotein lipase and properties of the inactive monomer." J Biol Chem **279**(48): 49964-72.
Lopez-Miranda, J., C. Williams, et al. (2007). "Dietary, physiological, genetic and pathological influences on postprandial lipid metabolism." Br J Nutr **98**(3): 458-73.
Ma, H. C., T. W. Lin, et al. (2008). "Hepatitis C virus ARFP/F protein interacts with cellular MM-1 protein and enhances the gene trans-activation activity of c-Myc." J Biomed Sci **15**(4): 417-25.
Macdonald, A. and M. Harris (2004). "Hepatitis C virus NS5A: tales of a promiscuous protein." J Gen Virol **85**(Pt 9): 2485-502.
Mackenzie, J. (2005). "Wrapping things up about virus RNA replication." Traffic **6**(11): 967-77.
Mahley, R. W. and Z. S. Ji (1999). "Remnant lipoprotein metabolism: key pathways involving cell-surface heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E." J Lipid Res **40**(1): 1-16.
Maillard, P., T. Huby, et al. (2006). "The interaction of natural hepatitis C virus with human scavenger receptor SR-BI/Cla1 is mediated by ApoB-containing lipoproteins." FASEB J **20**(6): 735-7.
Maillard, P., K. Krawczynski, et al. (2001). "Nonenveloped nucleocapsids of hepatitis C virus in the serum of infected patients." J Virol **75**(17): 8240-50.
Maillard, P., J. P. Lavergne, et al. (2004). "Fcgamma receptor-like activity of hepatitis C virus core protein." J Biol Chem **279**(4): 2430-7.
Masciopinto, F., C. Giovani, et al. (2004). "Association of hepatitis C virus envelope proteins with exosomes." Eur J Immunol **34**(10): 2834-42.
McLauchlan, J. (2000). "Properties of the hepatitis C virus core protein: a structural protein that modulates cellular processes." J Viral Hepat **7**(1): 2-14.
McLauchlan, J. (2009). "Hepatitis C virus: viral proteins on the move." Biochem Soc Trans **37**(Pt 5): 986-90.
McLauchlan, J. (2009). "Lipid droplets and hepatitis C virus infection." Biochim Biophys Acta **1791**(6): 552-9.
Mead, J. R., S. A. Irvine, et al. (2002). "Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease." J Mol Med **80**(12): 753-69.
Meertens, L., C. Bertaux, et al. (2006). "Hepatitis C virus entry requires a critical postinternalization step and delivery to early endosomes *via* clathrin-coated vesicles." J Virol **80**(23): 11571-8.
Mercer, D. F., D. E. Schiller, et al. (2001). "Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers." Nat Med **7**(8): 927-33.
Merkel, M., R. H. Eckel, et al. (2002). "Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake, and regulation." J Lipid Res **43**(12): 1997-2006.
Merkel, M., Y. Kako, et al. (1998). "Catalytically inactive lipoprotein lipase expression in muscle of transgenic mice increases very low density lipoprotein uptake: direct evidence that lipoprotein lipase bridging occurs *in vivo*." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(23): 13841-6.
Meuleman, P., J. Hesselgesser, et al. (2008). "Anti-CD81 antibodies can prevent a hepatitis C virus infection *in vivo*." Hepatology **48**(6): 1761-8.
Meuleman, P. and G. Leroux-Roels (2008). "The human liver-uPA-SCID mouse: a model for the evaluation of antiviral compounds against HBV and HCV." Antiviral Res **80**(3): 231-8.

Meuleman, P., L. Libbrecht, et al. (2005). "Morphological and biochemical characterization of a human liver in a uPA-SCID mouse chimera." Hepatology **41**(4): 847-56.
Meuleman, P., P. Vanlandschoot, et al. (2003). "A simple and rapid method to determine the zygosity of uPA-transgenic SCID mice." Biochem Biophys Res Commun **308**(2): 375-8.
Meunier, J. C., R. E. Engle, et al. (2005). "Evidence for cross-genotype neutralization of hepatitis C virus pseudo-particles and enhancement of infectivity by apolipoprotein C1." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(12): 4560-5.
Meunier, J. C., R. S. Russell, et al. (2008). "Apolipoprotein c1 association with hepatitis C virus." J Virol **82**(19): 9647-56.
Meurs, E. F. and A. Breiman (2007). "The interferon inducing pathways and the hepatitis C virus." World J Gastroenterol **13**(17): 2446-54.
Miyanari, Y., K. Atsuzawa, et al. (2007). "The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production." Nat Cell Biol **9**(9): 1089-97.
Miyanari, Y., M. Hijikata, et al. (2003). "Hepatitis C virus non-structural proteins in the probable membranous compartment function in viral genome replication." J Biol Chem **278**(50): 50301-8.
Molina, S., V. Castet, et al. (2007). "The low-density lipoprotein receptor plays a role in the infection of primary human hepatocytes by hepatitis C virus." J Hepatol **46**(3): 411-9.
Moradpour, D., F. Penin, et al. (2007). "Replication of hepatitis C virus." Nat Rev Microbiol **5**(6): 453-63.
Mori, Y., K. Moriishi, et al. (2008). "Hepatitis C virus core protein: its coordinate roles with PA28gamma in metabolic abnormality and carcinogenicity in the liver." Int J Biochem Cell Biol **40**(8): 1437-42.
Morikawa, K., Z. Zhao, et al. (2007). "The roles of CD81 and glycosaminoglycans in the adsorption and uptake of infectious HCV particles." J Med Virol **79**(6): 714-23.
Moriya, K., H. Fujie, et al. (1998). "The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice." Nat Med **4**(9): 1065-7.
Myrmel, H., E. Ulvestad, et al. (2009). "The hepatitis C virus enigma." APMIS **117**(5-6): 427-39.
Naranatt, P. P., H. H. Krishnan, et al. (2005). "Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus modulates microtubule dynamics *via* RhoA-GTP-diaphanous 2 signaling and utilizes the dynein motors to deliver its DNA to the nucleus." J Virol **79**(2): 1191-206.
Neuger, L., S. Vilaro, et al. (2004). "Effects of heparin on the uptake of lipoprotein lipase in rat liver." BMC Physiol **4**(1): 13.
Nielsen, S. U., M. F. Bassendine, et al. (2006). "Association between hepatitis C virus and very-low-density lipoprotein (VLDL)/LDL analyzed in iodixanol density gradients." J Virol **80**(5): 2418-28.
Ogawa, K., T. Hishiki, et al. (2009). "Hepatitis C virus utilizes lipid droplet for production of infectious virus." Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci **85**(7): 217-28.
Owen, D. M., H. Huang, et al. (2009). "Apolipoprotein E on hepatitis C virion facilitates infection through interaction with low-density lipoprotein receptor." Virology **394**(1): 99-108.
Page, S., A. Judson, et al. (2006). "Interaction of lipoprotein lipase and receptor-associated protein." J Biol Chem **281**(20): 13931-8.
Pang, P. S., E. Jankowsky, et al. (2002). "The hepatitis C viral NS3 protein is a processive DNA helicase with cofactor enhanced RNA unwinding." EMBO J **21**(5): 1168-76.
Pawlotsky, J. M. (2003). "Mechanisms of antiviral treatment efficacy and failure in chronic hepatitis C." Antiviral Res **59**(1): 1-11.

Pawlotsky, J. M., S. Chevaliez, et al. (2007). "The hepatitis C virus life cycle as a target for new antiviral therapies." Gastroenterology **132**(5): 1979-98.
Pawlotsky, J. M., G. Germanidis, et al. (1999). "Evolution of the hepatitis C virus second envelope protein hypervariable region in chronically infected patients receiving alpha interferon therapy." J Virol **73**(8): 6490-9.
Penin, F., J. Dubuisson, et al. (2004). "Structural biology of hepatitis C virus." Hepatology **39**(1): 5-19.
Perlemuter, G., A. Sabile, et al. (2002). "Hepatitis C virus core protein inhibits microsomal triglyceride transfer protein activity and very low density lipoprotein secretion: a model of viral-related steatosis." FASEB J **16**(2): 185-94.
Perrault, M. and E. I. Pecheur (2009). "The hepatitis C virus and its hepatic environment: a toxic but finely tuned partnership." Biochem J **423**(3): 303-14.
Peterson, J., W. Y. Fujimoto, et al. (1992). "Human lipoprotein lipase: relationship of activity, heparin affinity, and conformation as studied with monoclonal antibodies." J Lipid Res **33**(8): 1165-70.
Petit, M. A., M. Lievre, et al. (2005). "Enveloped particles in the serum of chronic hepatitis C patients." Virology **336**(2): 144-53.
Pietschmann, T., V. Lohmann, et al. (2002). "Persistent and transient replication of full-length hepatitis C virus genomes in cell culture." J Virol **76**(8): 4008-21.
Pileri, P., Y. Uematsu, et al. (1998). "Binding of hepatitis C virus to CD81." Science **282**(5390): 938-41.
Ploss, A., M. J. Evans, et al. (2009). "Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells." Nature **457**(7231): 882-6.
Poynard, T., F. Imbert-Bismut, et al. (2004). "Overview of the diagnostic value of biochemical markers of liver fibrosis (FibroTest, HCV FibroSure) and necrosis (ActiTest) in patients with chronic hepatitis C." Comp Hepatol **3**(1): 8.
Prince, A. M., T. Huima-Byron, et al. (1996). "Visualization of hepatitis C virions and putative defective interfering particles isolated from low-density lipoproteins." J Viral Hepat **3**(1): 11-7.
Radtke, K., K. Dohner, et al. (2006). "Viral interactions with the cytoskeleton: a hitchhiker's guide to the cell." Cell Microbiol **8**(3): 387-400.
Ramsamy, T. A., J. Boucher, et al. (2003). "HDL regulates the displacement of hepatic lipase from cell surface proteoglycans and the hydrolysis of VLDL triacylglycerol." J Lipid Res **44**(4): 733-41.
Ramsamy, T. A., T. A. Neville, et al. (2000). "Apolipoprotein A-I regulates lipid hydrolysis by hepatic lipase." J Biol Chem **275**(43): 33480-6.
Ratinier, M., S. Boulant, et al. (2009). "Subcellular localizations of the hepatitis C virus alternate reading frame proteins." Virus Res **139**(1): 106-10.
Ray, R. B., K. Meyer, et al. (2000). "Hepatitis C virus core protein promotes immortalization of primary human hepatocytes." Virology **271**(1): 197-204.
Rehermann, B. (2009). "Hepatitis C virus versus innate and adaptive immune responses: a tale of coevolution and coexistence." J Clin Invest **119**(7): 1745-54.
Rhainds, D. and L. Brissette (2004). "The role of scavenger receptor class B type I (SR-BI) in lipid trafficking. defining the rules for lipid traders." Int J Biochem Cell Biol **36**(1): 39-77.
Roberts, E. A. and L. Yeung (2002). "Maternal-infant transmission of hepatitis C virus infection." Hepatology **36**(5 Suppl 1): S106-13.
Rocha-Perugini, V., C. Montpellier, et al. (2008). "The CD81 partner EWI-2wint inhibits hepatitis C virus entry." PLoS One **3**(4): e1866.

Rodionov, V. I. and G. G. Borisy (1997). "Microtubule treadmilling *in vivo*." Science **275**(5297): 215-8.
Roingeard, P. and C. Hourioux (2008). "Hepatitis C virus core protein, lipid droplets and steatosis." J Viral Hepat **15**(3): 157-64.
Roohvand, F., P. Maillard, et al. (2009). "Initiation of hepatitis C virus infection requires the dynamic microtubule network: role of the viral nucleocapsid protein." J Biol Chem **284**(20): 13778-91.
Rouille, Y., F. Helle, et al. (2006). "Subcellular localization of hepatitis C virus structural proteins in a cell culture system that efficiently replicates the virus." J Virol **80**(6): 2832-41.
Roussel, J., A. Pillez, et al. (2003). "Characterization of the expression of the hepatitis C virus F protein." J Gen Virol **84**(Pt 7): 1751-9.
Rumsey, S. C., J. C. Obunike, et al. (1992). "Lipoprotein lipase-mediated uptake and degradation of low density lipoproteins by fibroblasts and macrophages." J Clin Invest **90**(4): 1504-12.
Russell, R. S., J. C. Meunier, et al. (2008). "Advantages of a single-cycle production assay to study cell culture-adaptive mutations of hepatitis C virus." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(11): 4370-5.
Ruthel, G., G. L. Demmin, et al. (2005). "Association of ebola virus matrix protein VP40 with microtubules." J Virol **79**(8): 4709-19.
Sabile, A., G. Perlemuter, et al. (1999). "Hepatitis C virus core protein binds to apolipoprotein AII and its secretion is modulated by fibrates." Hepatology **30**(4): 1064-76.
Sakai, A., M. S. Claire, et al. (2003). "The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(20): 11646-51.
Sakamoto, N. and M. Watanabe (2009). "New therapeutic approaches to hepatitis C virus." J Gastroenterol **44**(7): 643-9.
Santamarina-Fojo, S., H. Gonzalez-Navarro, et al. (2004). "Hepatic lipase, lipoprotein metabolism, and atherogenesis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**(10): 1750-4.
Santantonio, T., J. Wiegand, et al. (2008). "Acute hepatitis C: current status and remaining challenges." J Hepatol **49**(4): 625-33.
Sarasin-Filipowicz, M., E. J. Oakeley, et al. (2008). "Interferon signaling and treatment outcome in chronic hepatitis C." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(19): 7034-9.
Saunier, B., M. Triyatni, et al. (2003). "Role of the asialoglycoprotein receptor in binding and entry of hepatitis C virus structural proteins in cultured human hepatocytes." J Virol **77**(1): 546-59.
Scarselli, E., H. Ansuini, et al. (2002). "The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus." EMBO J **21**(19): 5017-25.
Scholtes, C., O. Diaz, et al. (2008). "Enhancement of genotype 1 hepatitis C virus replication by bile acids through FXR." J Hepatol **48**(2): 192-9.
Schuster, C. and T. F. Baumert (2009). "EWI-2wint--a host cell factor inhibiting hepatitis C virus entry." J Hepatol **50**(1): 222-4.
Schutte, K., J. Bornschein, et al. (2009). "Hepatocellular carcinoma--epidemiological trends and risk factors." Dig Dis **27**(2): 80-92.
Sheikh, M. Y., J. Choi, et al. (2008). "Hepatitis C virus infection: molecular pathways to metabolic syndrome." Hepatology **47**(6): 2127-33.
Shimizu, Y. K., S. M. Feinstone, et al. (1996). "Hepatitis C virus: detection of intracellular virus particles by electron microscopy." Hepatology **23**(2): 205-9.
Simmonds, P., J. Bukh, et al. (2005). "Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes." Hepatology **42**(4): 962-73.

Soler, M., M. Pellerin, et al. (2002). "Quasispecies heterogeneity and constraints on the evolution of the 5' noncoding region of hepatitis C virus (HCV): relationship with HCV resistance to interferon-alpha therapy." Virology **298**(1): 160-73.

Stroes, E. S., M. C. Nierman, et al. (2008). "Intramuscular administration of AAV1-lipoprotein lipase S447X lowers triglycerides in lipoprotein lipase-deficient patients." Arterioscler Thromb Vasc Biol **28**(12): 2303-4.

Suzuki, T., K. Ishii, et al. (2007). "Hepatitis C viral life cycle." Adv Drug Deliv Rev **59**(12): 1200-12.

Sy, T. and M. M. Jamal (2006). "Epidemiology of hepatitis C virus (HCV) infection." Int J Med Sci **3**(2): 41-6.

Takahashi, K., S. Kishimoto, et al. (1992). "p26 protein and 33-nm particle associated with nucleocapsid of hepatitis C virus recovered from the circulation of infected hosts." Virology **191**(1): 431-4.

Tang, H. and H. Grise (2009). "Cellular and molecular biology of HCV infection and hepatitis." Clin Sci (Lond) **117**(2): 49-65.

Targett-Adams, P., G. Hope, et al. (2008). "Maturation of hepatitis C virus core protein by signal peptide peptidase is required for virus production." J Biol Chem **283**(24): 16850-9.

Tellinghuisen, T. L., M. J. Evans, et al. (2007). "Studying hepatitis C virus: making the best of a bad virus." J Virol **81**(17): 8853-67.

Thomson, B. J. (2009). "Hepatitis C virus: the growing challenge." Br Med Bull **89**: 153-67.

Thomssen, R. and S. Bonk (2002). "Virolytic action of lipoprotein lipase on hepatitis C virus in human sera." Med Microbiol Immunol **191**(1): 17-24.

Thomssen, R., S. Bonk, et al. (1992). "Association of hepatitis C virus in human sera with beta-lipoprotein." Med Microbiol Immunol **181**(5): 293-300.

Timpe, J. M., Z. Stamataki, et al. (2008). "Hepatitis C virus cell-cell transmission in hepatoma cells in the presence of neutralizing antibodies." Hepatology **47**(1): 17-24.

Trigatti, B. L., A. Rigotti, et al. (2000). "Cellular and physiological roles of SR-BI, a lipoprotein receptor which mediates selective lipid uptake." Biochim Biophys Acta **1529**(1-3): 276-86.

Tsao, M. L., C. H. Chao, et al. (2006). "Interaction of hepatitis C virus F protein with prefoldin 2 perturbs tubulin cytoskeleton organization." Biochem Biophys Res Commun **348**(1): 271-7.

Vassilaki, N. and P. Mavromara (2003). "Two alternative translation mechanisms are responsible for the expression of the HCV ARFP/F/core+1 coding open reading frame." J Biol Chem **278**(42): 40503-13.

Verges, M., A. Bensadoun, et al. (2004). "Endocytosis of hepatic lipase and lipoprotein lipase into rat liver hepatocytes *in vivo* is mediated by the low density lipoprotein receptor-related protein." J Biol Chem **279**(10): 9030-6.

Verhoeven, A. J., B. P. Neve, et al. (1999). "Secretion and apparent activation of human hepatic lipase requires proper oligosaccharide processing in the endoplasmic reticulum." Biochem J **337 (Pt 1)**: 133-40.

Voisset, C. and J. Dubuisson (2004). "Functional hepatitis C virus envelope glycoproteins." Biol Cell **96**(6): 413-20.

von Hahn, T., J. C. Yoon, et al. (2007). "Hepatitis C virus continuously escapes from neutralizing antibody and T-cell responses during chronic infection *in vivo*." Gastroenterology **132**(2): 667-78.

Wakita, T., T. Pietschmann, et al. (2005). "Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome." Nat Med **11**(7): 791-6.

Walewski, J. L., T. R. Keller, et al. (2001). "Evidence for a new hepatitis C virus antigen encoded in an overlapping reading frame." RNA **7**(5): 710-21.
Wang, H., D. Gilham, et al. (2007). "Proteomic and lipid characterization of apolipoprotein B-free luminal lipid droplets from mouse liver microsomes: implications for very low density lipoprotein assembly." J Biol Chem **282**(45): 33218-26.
Webster, D. P., P. Klenerman, et al. (2009). "Development of novel treatments for hepatitis C." Lancet Infect Dis **9**(2): 108-17.
Wegner, A. (1976). "Head to tail polymerization of actin." J Mol Biol **108**(1): 139-50.
Welte, M. A. (2004). "Bidirectional transport along microtubules." Curr Biol **14**(13): R525-37.
Wileman, T. (2007). "Aggresomes and pericentriolar sites of virus assembly: cellular defense or viral design?" Annu Rev Microbiol **61**: 149-67.
Williams, K. J. (2008). "Molecular processes that handle -- and mishandle -- dietary lipids." J Clin Invest **118**(10): 3247-59.
Wolk, B., B. Buchele, et al. (2008). "A dynamic view of hepatitis C virus replication complexes." J Virol **82**(21): 10519-31.
Wong, H. and M. C. Schotz (2002). "The lipase gene family." J Lipid Res **43**(7): 993-9.
Xie, Z. C., J. I. Riezu-Boj, et al. (1998). "Transmission of hepatitis C virus infection to tree shrews." Virology **244**(2): 513-20.
Xu, Z., J. Choi, et al. (2003). "Hepatitis C virus f protein is a short-lived protein associated with the endoplasmic reticulum." J Virol **77**(2): 1578-83.
Ye, J. (2007). "Reliance of host cholesterol metabolic pathways for the life cycle of hepatitis C virus." PLoS Pathog **3**(8): e108.
Zhao, X., Z. Y. Tang, et al. (2002). "Primary hepatocytes of Tupaia belangeri as a potential model for hepatitis C virus infection." J Clin Invest **109**(2): 221-32.
Zheng, A., F. Yuan, et al. (2007). "Claudin-6 and claudin-9 function as additional coreceptors for hepatitis C virus." J Virol **81**(22): 12465-71.
Zheng, C., S. J. Murdoch, et al. (2006). "Lipoprotein lipase bound to apolipoprotein B lipoproteins accelerates clearance of postprandial lipoproteins in humans." Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(4): 891-6.
Zhong, J., P. Gastaminza, et al. (2005). "Robust hepatitis C virus infection *in vitro*." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(26): 9294-9.
Zoulim, F., M. Chevallier, et al. (2003). "Clinical consequences of hepatitis C virus infection." Rev Med Virol **13**(1): 57-68.

ANNEXES

JOURNAL OF VIROLOGY, June 2007, p. 6276–6285 Vol. 81, No. 12
0022-538X/07/$08.00+0 doi:10.1128/JVI.02538-06
Copyright © 2007, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Construction and Characterization of a Full-Length Infectious Simian T-Cell Lymphotropic Virus Type 3 Molecular Clone[▽]

Sébastien Alain Chevalier,[1]† Marine Walic,[1]† Sara Calattini,[1] Adeline Mallet,[2] Marie-Christine Prévost,[2] Antoine Gessain,[1] and Renaud Mahieux[1]*

Unité d'Epidémiologie et Physiopathologie des Virus Oncogènes, CNRS URA 3015, Département de Virologie, Institut Pasteur, 28 rue du Dr. Roux, 75015 Paris, France,[1] and Plateforme de Microscopie Electronique, Institut Pasteur, 25 rue du Dr. Roux, 75015 Paris, France[2]

Received 20 October 2006/Accepted 27 March 2007

Together with their simian T-cell lymphotropic virus (STLV) equivalent, human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1), HTLV-2, and HTLV-3 form the primate T-cell lymphotropic virus (PTLV) group. Over the years, understanding the biology and pathogenesis of HTLV-1 and HTLV-2 has been widely improved by the creation of molecular clones. In contrast, so far, PTLV-3 experimental studies have been restricted to the overexpression of the *tax* gene using reporter assays. We have therefore decided to construct an STLV-3 molecular clone. We generated a full-length STLV-3 proviral clone (8,891 bp) by PCR amplification of overlapping fragments. This STLV-3 molecular clone was then transfected into 293T cells. Reverse transcriptase PCR experiments followed by sequence analysis of the amplified products allowed us to establish that both *gag* and *tax/rex* mRNAs were transcribed. Western blotting further demonstrated the presence of the STLV-3 $p24^{gag}$ protein in the cell culture supernatant from transfected cells. Transient transfection of 293T cells and of 293T-long terminal repeat-green fluorescent protein cells with the STLV-3 clone promoted syncytium formation, a hallmark of PTLV Env expression, as well as the appearance of fluorescent cells, also demonstrating that the Tax3 protein was expressed. Virus particles were visible by electron microscopy. These particles are infectious, as demonstrated by our cell-free-infection experiments with purified virions. All together, our data demonstrate that the STLV-3 molecular clone is functional and infectious. This clone will give us a unique opportunity to study in vitro the different pX transcripts and the putative presence of antisense transcripts and to evaluate the PTLV-3 pathogenicity in vivo.

Together with their simian T-cell lymphotropic virus (STLV) counterpart, human T-cell lymphotropic viruses (HTLVs) form the primate T-cell lymphotropic virus (PTLV) group (25). Until recently, only two HTLV types were known to occur in humans. We and others have lately reported the discovery of HTLV type 3 (HTLV-3) in two Cameroonese inhabitants (7, 63). The HTLV-3 sequence is highly related to Central African STLV-3 strains that are present in a number of monkey species living in that area (6, 55). The genomic organizations of HTLV-3 and STLV-3 proviruses are similar, with the presence of two long terminal repeat (LTR) sequences flanking the *gag*, *pol*, *env*, *tax*, and *rex* genes (6, 36, 37, 55, 58, 59). Of note, both the STLV-3 and HTLV-3 LTRs lack one Tax-responsive element compared to those of HTLV-1 or HTLV-2 (6, 36, 37, 55, 58, 59). Nevertheless, the PTLV-3 Tax protein can efficiently drive transcription from the PTLV-3 LTR as well as from the HTLV-1 and HTLV-2 LTRs (6, 11).

The number of open reading frames (ORFs) that are present in the PTLV-3 pX region is still a matter of debate; the STLV-3 prototype ($STLV\text{-}3_{PH969}$) pX region was reported to contain only one additional ORF, whose mRNA was amplified by reverse transcriptase PCR (RT-PCR) (57). In silico analyses suggested that this mRNA could be translated into a putative 84-amino-acid-long protein designated RORFII, which shares a number of similarities with the HTLV-1 $p12^{I}$ protein (57). However, the presence of RORFII mRNA was not detected when two other STLV-3 strain (PPA-F3 and CTO-604) pX transcripts were analyzed by RT-PCR (36, 37). Consequently, it is not clear whether, apart from Tax and Rex, additional ORFs are generally present in the STLV-3/HTLV-3 pX sequence.

Initial HTLV experimental studies have been restricted to an examination of infected patients (43), the overexpression of individual genes (mainly *tax*) using reporter assays (53, 54), or characterizations of HTLV-infected cell lines (44, 48). Although these studies were helpful, understanding the biology of HTLVs and their pathogenesis was later widely improved by the creation of HTLV-1 and HTLV-2 molecular clones (9, 12, 17, 19, 32, 39, 49, 50, 68) (for a review, see reference 3). Subsequently, deletion, point mutation, or domain-swapping analyses have allowed investigators to define more accurately the importance of a number of proteins encoded by the pX domain (for up-to-date reviews, see references 2 and 41), even though the recent discovery of an HTLV-1 antisense protein (HBZ) whose sequence partly covers the pX region (20) might imply that some of these results would benefit from being revisited.

The identification of factors that contribute to the potential pathogenicity of PTLV-3 would be feasible if a molecular clone that could be used in vitro and in vivo existed. The lack of

* Corresponding author. Mailing address: Unité d'Epidémiologie et Physiopathologie des Virus Oncogènes, CNRS URA 3015, Institut Pasteur, 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris cedex 15, France. Phone: (33)-1-45-68-89-06. Fax: (33)-1-40-61-34-65. E-mail: rmahieux@pasteur.fr.

† These authors contributed equally to this work.

▽ Published ahead of print on 11 April 2007.

TABLE 1. Sequence of the primers used for the amplification of the nine different STLV-3 PPA-F3 fragments

Primer fragment	Sequences of primer set	Positions within the genome[a]	Annealing temp (°C)
E	GGGGGGGAATTCTGTCGATGATGATGAGCCCCG GGAGATCTTTCATTTGCCAGGGG	1→33 1172←1150	60.6
G	TCTTAATTCAAGAAACCCCTGCGC GGAGTGCTTGAATGCTAACAGGGG	999→1022 2122←2099	60.5
H	CCCAGCAGAAGCAGCCTATCC CGGAGAGCGAGATAGAGCTGG	2048→2068 3247←3226	58.3
I	CTCTAAAGGCACCCCTGTCCTCCGC GAGACCGCCCCGGAGTAAGTATCCACCC	3191→3216 4438←4411	60.1
F	CGTCACTCACCTCCAGTACAAGCG GGGCATTGTATAGCGCAGGGG	4364→4387 5387←5367	59.4
D	GTATTCCCCCATTGGATAGCCAAACC GATGAGGAGGAGAAAGAGGGCC	5299→5324 6429←6408	60.9
B	CTCTCCCAATGGGCCCGAGAAGCC TGTAGAGCTGAGCTGACAACG	6361→6384 7433←7413	59.9
A	GGGGGGCTTTGTTCCGCTCGG CCTTCCTTGGGGCAAGGGCCG	7324→7344 8021←8001	62.6
C	CTCCCGTGCCAAAAGGAAATTGCC TTTTTTTCGCGATGTTTGCTTTCTTCCCTAGGGCTAGC	7930→7953 8891←8854	60.3

[a] The direction of the arrow indicates the direction of transcription.

HTLV-3-infected cell lines and the restricted amount of HTLV-3_{Py843} DNA that is available, combined with the strong sequence homologies between HTLV-3_{Py843} and some STLV-3 strains, prompted us to construct an STLV-3 molecular clone. We describe here for the first time the construction of a full-length STLV-3_{PPA-F3} provirus (8,891 bp), which was inserted into the SV2neo plasmid. SV2neo has previously been used for constructing an HTLV-2 molecular clone (51). Our results report for the first time a method for generating a full-length STLV-3 proviral clone. This clone (SV2neo$_{PPA-F3}$) produces infectious STLV-3 viral particles when transfected into 293T cells. SV2neo$_{PPA-F3}$ can now be used in vitro and in vivo. It will allow us to study the different pX transcripts in vitro. More importantly, it will give us a unique opportunity to investigate the tropism of the STLV-3 virus in vivo, the immune response following infection, and viral persistence.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture. 293T-LTR-green fluorescent protein (GFP) (15) and 293T cell lines were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with fetal bovine serum (10%) and antibiotics (penicillin, 100 U/ml; streptomycin, 100 μg/ml). Both cell lines were maintained at 37°C in 5% CO_2.

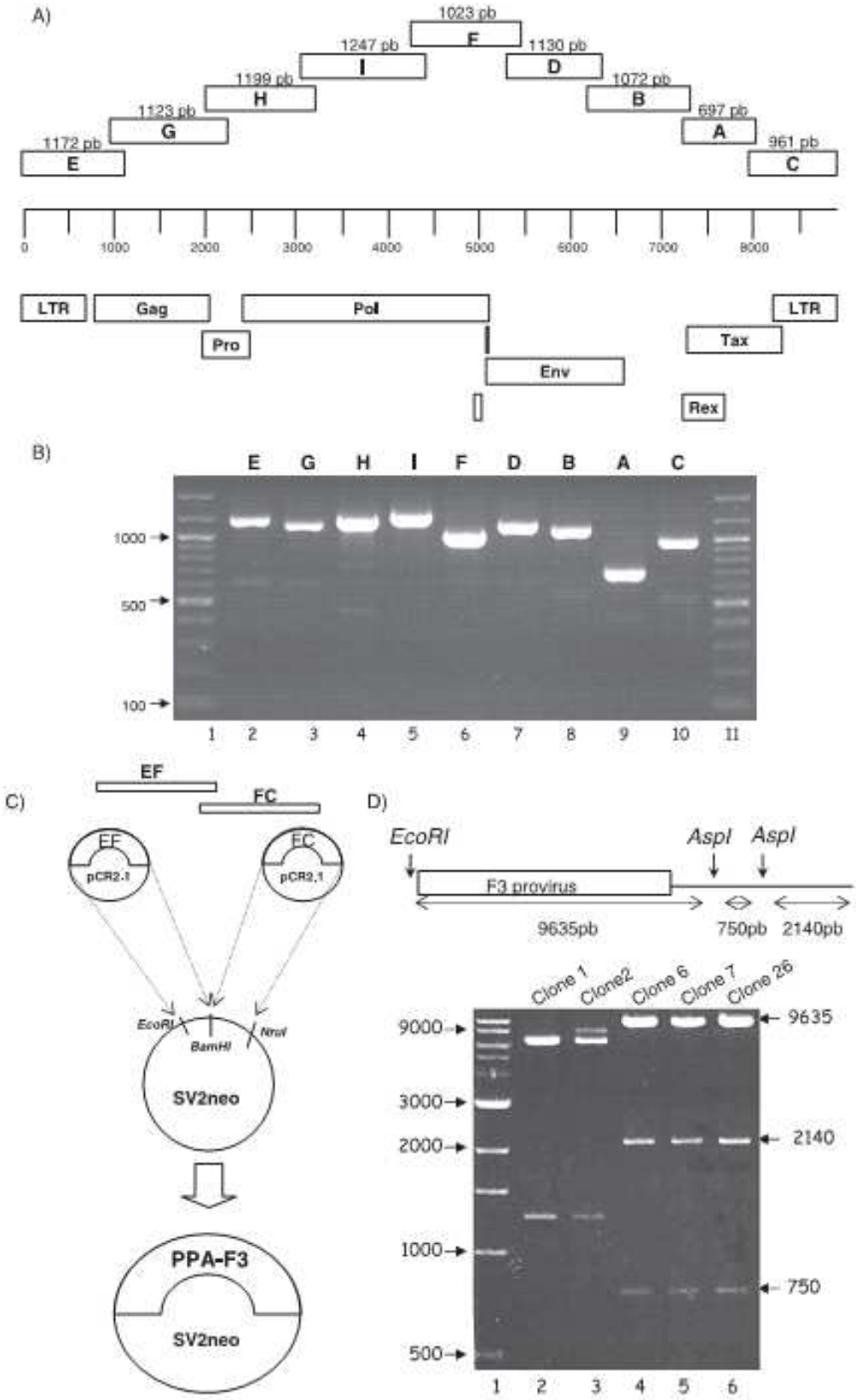
Construction of the STLV-3_{PPA-F3} molecular clone. High-molecular-weight DNA was extracted (QIAmp DNA blood minikit; QIAGEN) from the blood of a *Papio anubis* monkey (PPA-F3) held at the Marseille CNRS cognitive primate center (Joel Fagot). Nine subgenomic overlapping fragments (A to I) representing the complete STLV-3_{PPA-F3} proviral sequence (8,891 bp) were then amplified. The PCR mixtures contained 1 μg of DNA, 5 μl 10× *Pfu* buffer, a 0.2 mM concentration of each deoxynucleoside triphosphate (Roche), 2.5 U *PfuTurbo* DNA polymerase (Stratagene), and 10 pmol of each primer. Table 1 shows the primer sequences and the corresponding annealing temperatures. PCR products were purified on a 1% agarose gel (QIAquick gel extraction; QIAGEN) and cloned into the pCR2.1 vector (TA cloning; Invitrogen). Larger fragments (from E to F [fragment EF] and from F to C [fragment FC]) were then generated, as previously described (35). STLV-3_{PPA-F3} provirus was inserted into the low-copy-number SV2neo plasmid. SV2neo encodes ampicillin resistance in bacteria and G418 resistance in mammalian cells (9, 49). Both SV2neo and SV2neo$_{PPA-F3}$ were grown in bacteria (SCS110; Stratagene) in the presence of ampicillin at 30°C in limited volumes in order to decrease the rate of recombination that frequently occurs in the presence of the LTR sequences.

At each step of the provirus construction, 6 to 10 clones were sequenced using the BigDye terminator kit and an ABI 3100 automated sequencer (Applied Biosystems) as described previously (6).

RT-PCR. Twenty-four hours posttransfection of 293T cells, total RNA was extracted with an RNeasy mini kit (QIAGEN) and treated twice with the DNase I/RNase-free DNA set (QIAGEN) to avoid any carryover of the proviral plasmid (6). Total RNA (0.5 μg) was used as a matrix for RT-PCR with a one-step RT-PCR kit (QIAGEN). PCR was performed using the 602LTR and 602MVB Rex ex2 primers, which allow the amplification of a 424-bp PCR product corresponding to the spliced *tax/rex* mRNA (37). In a second series of RT-PCR experiments, gag-specific primers (Gsens, 5′ICTTAATTCAAGAAACCCCTG CGC3′, and Sc gag 1432 antisense, 5′TCTCCGAAGCCCTTGCTGATTTGG3′) were also used to amplify a 498-bp sequence.

p19 ELISA. Cell culture supernatant was collected at 24 and 48 h posttransfection and tested with the Retrotek HTLV-I/2 p19 antigen enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Zeptometrix). This kit allows the detection of the p19^{gag} proteins of both HTLV-1 and HTLV-2 (1, 4).

Western blotting. 293T-LTR-GFP cells were transfected with the Polyfect reagent (QIAGEN) with 4 μg of SV2neo$_{PPA-F3}$, with 3 μg of SV2neo$_{PPA-F3}$ and 1 μg of pSG5M-Tax3$_{mut}$ or with 4 μg of the SV2neo backbone vector. Ten days later, 10 ml of growth medium was collected, clarified by low-speed centrifugation (2,500 rpm for 5 min), and filtered through a 45-μm filter. Virus was then layered on a 20% glycerol gradient (18) and pelleted by centrifugation in a SW28 rotor at 22,000 rpm for 2 h. The pellet was resuspended in lysis buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.4], 120 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% NP-40, 0.2 mM Na_3VO_4, 1 mM dithiothreitol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride) in the presence of protease inhibitors (Complete; Boehringer). Cell debris were pelleted by centrifugation. The protein concentration was determined by the Bradford assay (Bio-Rad). Twenty microliters of each sample was resolved by electrophoresis on a 4 to 12% polyacrylamide-sodium dodecyl sulfate gel (NUPAGE; Invitrogen). Proteins were transferred to an Immobilon-P membrane (Millipore). Membranes were blocked in a 0.05% solution of phosphate-buffered saline (PBS)-


A)
1023 pb
F
1247 pb
I
1130 pb
D
1199 pb
H
1072 pb
B
1123 pb
G
697 pb
A
1172 pb
E
961 pb
C
0
1000
2000
3000
4000
5000
6000
7000
8000
LTR
Gag
Pol
LTR
Pro
Tax
Env
Rex
B)
E G H I F D B A C
1000
500
100
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
C)
EF
FC
EF
pCR2.1
FC
pCR2.1
EcoRI
BamHI
NruI
SV2neo
PPA-F3
SV2neo
D)
EcoRI
AspI AspI
F3 provirus
9635pb
750pb 2140pb
Clone 1
Clone2
Clone 6
Clone 7
Clone 26
9000
3000
2000
1000
500
9635
2140
750
1 2 3 4 5 6

Tween 20 with 5% milk and incubated with sera obtained from two STLV-3-infected primates (PPA-F8 or CTO-604 [data not shown]). The next day, the membranes were washed and incubated with anti-human horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (P.A.R.I.S.) and developed using the SuperSignal West Femto chemiluminescent-substrate kit (Pierce).

Immunofluorescence. 293T-LTR-GFP cells were transfected with 2 μg of SV2neo$_{PPA-F3}$ using the Polyfect reagent (QIAGEN) as described previously (35). Three days later, cells were washed with PBS, fixed with 4% paraformaldehyde (Sigma), and visualized with a Zeiss Axioplan 2 imaging microscope (magnification, ×40) using a Zeiss Axiocam HRc (color) camera and the Zeiss ApoTome software as described previously (10).

Secondary infection. 293T cells were transfected twice (day 0 and day 1) with 4 μg of either SV2neo$_{PPA-F3}$ or the SV2neo empty vector, using the Polyfect reagent (QIAGEN). Forty-eight hours later, 8 ml of growth medium was collected from two 60-mm-diameter dishes and clarified by low-speed centrifugation (2,500 rpm for 5 min) then filtered through a 45-μm filter. Virus was then layered on a 20% glycerol gradient (18) and pelleted by centrifugation in a SW28 rotor at 22000 rpm for 2 h. The pellet was then resuspended in 200 μl of DMEM without fetal bovine serum in the presence of 10 μg/ml of DEAE-dextran as previously described (17). As a control, the virus pellet was heated at 70°C for 2 h. 293T-LTR GFP indicator cells were incubated with 200 μl of the resuspended virus in a total volume of 2 ml of DMEM in the absence of fetal bovine serum for 2 h. Complete medium (8 ml) was then added and changed twice a week. One week later, live cells were visualized with a Zeiss Axioplan 2 imaging microscope (magnification, ×40) using a Zeiss Axiocam HRc (color) camera and the Zeiss ApoTome software as described previously (10).

Syncytium formation. 293T-LTR-GFP cells (15) were transfected with the Polyfect reagent (QIAGEN) with SV2neo$_{PPA-F3}$ or with the SV2neo empty vector. Forty-eight hours posttransfection, cell culture medium was removed, the cells were washed with PBS and fixed, and pictures were taken as described above.

Electron microscopy. For ultrastructural analyses, cells were fixed overnight at 4°C with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.4. Samples were postfixed with 1% osmium tetroxide in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.4, for 1 h and then with 2% uranyl acetate in 30% methanol for 1 h. Samples were then dehydrated in ethanol and embedded in epoxy resin. Ultrathin sections were stained with 2% uranyl acetate and lead citrate. Sections were examined using a Jeol JEM1010 transmission electron microscope (Jeol, Tokyo, Japan) at 80 kV and an Eloise MegaView III camera (Eloise SARL, Roissy, France).

RESULTS

Because an STLV-3-infected immortalized or transformed cell line is not available to us, it was not possible to transfer the STLV-3 provirus from bacteriophage lambda to a plasmid vector, as previously reported for the construction of the HTLV-1 or of HTLV-2 molecular clones (9, 12, 17, 32, 39, 50, 51). For this reason, we chose a different approach that has been used for constructing full-length infectious foamy virus from subgenomic DNA fragments (62, 67). This method relies on the sequential addition of defined DNA fragments by PCR (Fig. 1A). To this end, we first amplified nine different partially overlapping sequences (A to I) from STLV-3$_{PPA-F3}$ high-molecular-weight DNA and cloned them into the pCR2.1 plasmid. The size of each fragment ranged from 961 bp to 1,247 bp (Fig. 1B). These nine pieces were then assembled into two larger fragments (EF and FC) by using a previously described technique (35), and ultimately, the complete genome was inserted into the SV2neo plasmid (Fig. 1C). SV2neo is a low-copy-number plasmid whose use drastically reduces the generation of deleted clones (3). Recombinant plasmids were screened by digesting the plasmid DNA with EcoRI and AspI (Fig. 1D, top panel). Among the plasmids tested, three clones display the expected restriction pattern, i.e., three bands at 9,636 bp, 2,140 bp, and 750 bp. Each of these recombinant plasmids therefore contains the full-length STLV-3 provirus (Fig. 1D, lower panel, lane 4 [clone 6], lane 5 [clone 7], and lane 6 [clone 26]). Each plasmid was then fully sequenced on both strands. Clone 26 (designated SV2neo$_{PPA-F3}$ throughout this article) was subsequently used for all analyses. In some cases, clones 6 and 7, which are also wild type in sequence, were used.

Transfection of SV2neo$_{PPA-F3}$ and expression of viral mRNAs. To determine whether the SV2neo$_{PPA-F3}$ molecular clone was capable of directing mRNA synthesis, total RNA was extracted from transiently transfected 293T cells, treated twice with DNase I, and subjected to RT-PCR to search for the presence of nonspliced *gag* or doubly spliced *tax/rex* viral messengers. As expected, a band corresponding to *gag* (498 bp) was present in 293T cells transfected with each of the SV2neo$_{PPA-F3}$ clones (i.e., clone 6, 7, or 26) but not in SV2neo or in mock-transfected cells (Fig. 2A, lanes 4, 5, and 6 versus lanes 2 and 3). The absence of amplicon when RT was omitted demonstrates the lack of DNA carryover in the RNA preparation (Fig. 2A, lane 7). All together, these results allow us to conclude that *gag* mRNA is present specifically in the SV2neo$_{PPA-F3}$-transfected cells.

We next determined whether *tax/rex* mRNA could also be detected (see Fig. 2B for the primer positions). A signal (424 bp) corresponding to part of the doubly spliced *tax/rex* messenger was specifically detected in SV2neo$_{PPA-F3}$-transfected 293T cells (Fig. 2C, lanes 46) to but not in SV2neo or in mock-transfected cells (Fig. 2B, lanes 2 and 3). We cloned and sequenced the 424-bp PCR product. Sequence analysis allowed us to demonstrate unambiguously that the PCR amplicon corresponded to the *tax/rex* mRNA (Fig. 2D). All together, these results demonstrate that both nonspliced and spliced mRNAs are transcribed following the transfection of SV2neo$_{PPA-F3}$ plasmid into 293T cells.

Viral protein expression. To determine whether viral proteins are translated, the supernatant of SV2neo$_{PPA-F3}$-transfected 293T cells was concentrated by ultracentrifugation and proteins were analyzed by electrophoresis using a monkey serum (STLV-3$_{PPA-F8}$) that has previously been shown to contain STLV-3 antibodies (36). A band corresponding to the STLV-3 p24^{gag} protein was specifically observed in the supernatant

FIG. 1. Construction of the SV2neo$_{PPA-F3}$ molecular clone. (A) Representation of the nine partially overlapping STLV-3$_{PPA-F3}$ fragments used for the construction of the molecular clone and schematic representation of the STLV-3$_{PPA-F3}$ genome. The primers used for the PCR experiments are described in Table 1. (B) Analysis of the STLV-3$_{PPA-F3}$ amplified products cloned into the pCR2.1 vector. The PCR products (lanes 2 to 10) were analyzed on a 1% agarose gel. Lanes 1 and 11, 100-bp DNA ladder. Numbers at the left are in base pairs. The PCR product sizes are indicated in panel A. (C) The STLV-3$_{PPA-F3}$ genomic intermediates EF (5,387 bp) and FC (4,527 bp) were assembled into the SV2neo vector in order to obtain the complete SV2neo$_{PPA-F3}$ proviral genome. (D) Restriction map of the full-length STLV-3$_{PPA-F3}$ genome inserted into the SV2neo plasmid. Numbers at the left of the blot are in base pairs. Lane 1, 1-kb DNA ladder; lanes 2 to 6, recombinant plasmids digested with EcoRI and AspI that were on a 0.7% agarose gel. The expected restriction pattern consists of three bands at 9,636 bp, 2,140 bp, and 750 bp.

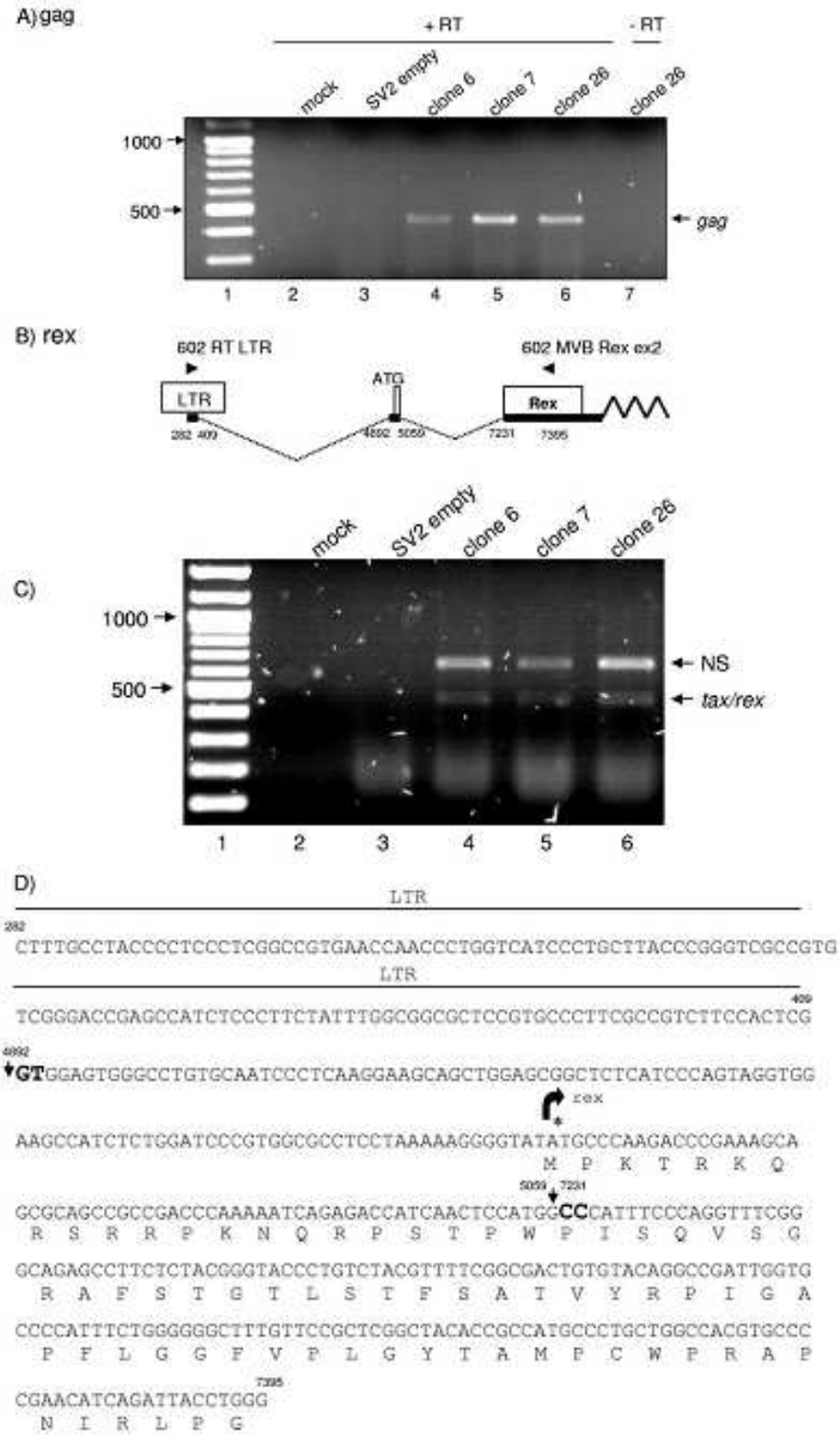


FIG. 2. RT-PCR analysis of viral SV2neo$_{PPA-F3}$ RNAs. Total RNA was extracted from transiently transfected 293T cells, treated with DNase I, and subjected to RT-PCR to search for the presence of (A) nonspliced *gag* (498-bp) or (B, C) doubly spliced *tax/rex* (424-bp) viral messengers. (A) Lane 1, 100-bp DNA ladder; lane 2, mock-transfected cells; lane 3, RNA from SV2neo-transfected cells; lanes 4 to 6, RNA from cells transfected with SV2neo$_{PPA-F3}$ clones 6, 7, and 26, respectively (these three recombinant plasmids contain the wild-type SV2neo$_{PPA-F3}$ sequence).

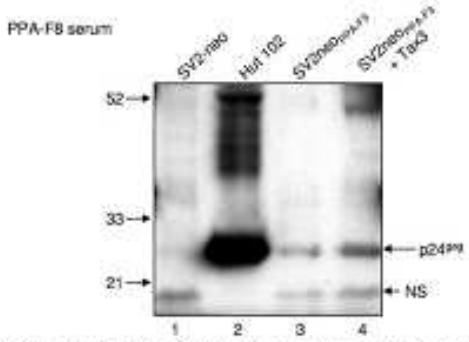


FIG. 3. Expression of virion structural p24^{gag} protein released into the cell culture supernatant from 293T cells transfected with the SV2neo$_{PPA-F3}$ clone. 293T cells were transfected with SV2neo (lane 1), SV2neo$_{PPA-F3}$ (lane 3), or SV2neo$_{PPA-F3}$ plus pSG5M-Tax3 (lane 4). Ten days later, growth media were collected, clarified by low-speed centrifugation, and filtered. Virus was then layered on a 20% glycerol gradient and centrifuged. The pellet was then resuspended in lysis buffer. Each sample was resolved by electrophoresis on a 4 to 12% sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel. Proteins were transferred to a membrane and incubated with a serum obtained from an STLV-3-infected primate (PPA-F8). For lane 2, HTLV-1 HUT-102 growth medium was also collected and processed under the experimental conditions described above. NS, nonspecific. This Western blot is representative of blots from two different experiments. Numbers at the left are in kilodaltons.

obtained from SV2neo$_{PPA-F3}$-transfected cells (Fig. 3, lane 3) but not in the protein extracts from SV2neo-transfected cells (Fig. 3, lane 1). To determine whether the simian Tax3 protein increased the production of viral antigens, the cells were also cotransfected with a Tax3 plasmid, as has been done previously for HTLV-1 molecular-clone experiments (32, 42). The presence of Tax3 modestly increased the amount of STLV-3 p24 in the cell supernatant (Fig. 3, lane 3 versus lane 4). All together, our results are similar to those of Green, who demonstrated previously that HTLV-2 sera detect mainly HTLV-2 p24^{gag} in extracts from cells transfected with the pH6neo HTLV-2 molecular clone (23, 24). Overall, our results demonstrate that STLV-3$_{PPA-F3}$-transfected cells express STLV-3 p24^{gag} protein. Similar Western blot results were obtained when the experiment was repeated with the serum from another STLV-3-infected animal (STLV-3$_{604}$ [data not shown]).

Interestingly, the STLV-3$_{PPA-F8}$ serum also cross-reacted with HTLV-1 p24^{gag} protein present in HUT-102-infected cells (Fig. 3, lane 2). These results are consistent with previous reports which demonstrated that STLV-3 sera cross-react with HTLV-1 p24^{gag} in a commercial Western blot assay (36, 37, 56, 59). We then performed the opposite experiment and tested whether commercial monoclonal or polyclonal anti-HTLV-1 p19^{gag} or anti HTLV-1 p24^{gag} cross-react with STLV-3 p19^{gag} and p24^{gag} proteins by Western blotting. While all of antibodies tested detected HTLV-1 p19^{gag} and p24^{gag} proteins present in HUT-102 HTLV-1-infected cells, none of them allowed the detection of STLV-3 p19^{gag} or p24^{gag} (data not shown). Therefore, so far, the STLV-3 sera are the only available source of anti-STLV-3 antibodies.

p19^{gag} detection. We also tested whether SV2neo$_{PPA-F3}$ p19^{gag} could be detected in the supernatant of STLV-3$_{PPA-F3}$-transfected cells using a commercial ELISA assay that has been widely used to detect p19^{gag} in the supernatants of cells transfected with HTLV-1 or HTLV-2 molecular clones (16, 32, 40, 42, 52, 64). Although p19^{gag} protein was easily measured in the supernatants of HUT-102, C8166, and C19 cells (HTLV-1 and HTLV-2, respectively), we measured only very small amounts of p19^{gag} protein in supernatant samples from SV2neo$_{PPA-F3}$-transfected cells (data not shown). This value is not significantly higher than the background value. This result was in fact not entirely unanticipated, since (i) the Zeptometrix test has been built for detecting HTLV-1 and HTLV-2 p19^{gag} and (ii) most STLV-3 sera do not cross-react with plates coated with the HTLV-1 p19^{gag} protein from commercial Western blot assay kits (36, 37).

Envelope expression and syncytium formation. HTLV is transmitted mainly by cell-to-cell contact, which leads to the production of syncytia in vitro. Syncytium formation has been attributed to the interaction of the viral envelope on the surfaces of infected cells with the viral receptors that are present on the surfaces of adjacent cells (33). The ability of HTLV-1-infected cells (14, 27), of HTLV-2-infected cells (61), or of STLV-1-expressing cells (60) to form syncytia with target cells has been used as a model for cell-to-cell viral transfer. This phenomenon occurs in a broad range of cell lines (31). Since it is similar to other PTLVs, STLV-3 is expected to induce the formation of syncytia when amplified in tissue culture, if the infected cells express the envelope proteins (TM and SU) and the target cells express the STLV-3 receptor. To test this hypothesis, 293T cells were transfected with plasmid SV2neo$_{PPA-F3}$ or SV2neo. After 2 days of culture, syncytia were observed in the SV2neo$_{PPA-F3}$ cells (Fig. 4A, panel a), while this was not the case for cells that were transfected with the SV2neo backbone vector (Fig. 4A, panel b). These results demonstrate that upon transfection of the SV2neo$_{PPA-F3}$ plasmid in 293T cells, STLV-3 envelope proteins were translated. Ultimately, the STLV-3 SU protein bound to the STLV-3 receptor on the surfaces of 293T cells, and STLV-3 TM triggered the fusion between the donor and target cell membranes. Whether the STLV-3 receptor is glucose transporter-1, neuropilin-1 (21, 29, 34), or another cellular protein (30) is currently unknown.

Tax expression. We have previously demonstrated that the simian Tax3 protein transactivates the HTLV-1 LTR (11). To determine whether the SV2neo$_{PPA-F3}$ plasmid directs the ex-

For lane 7, RT was not added to the PCR mix containing RNA extracted from clone 26-transfected cells. (B) RT-PCR strategy for amplifying the *rex* transcript. The primers used and their positions were previously described (37). (C) RNAs were tested for the presence of a band corresponding to the spliced *tax/rex* mRNA transcript. Lane 1, 100-bp DNA ladder; lane 2, mock-transfected cells; lane 3, RNA from SV2neo-transfected cells; lanes 4 to 6, RNA from cells transfected with STLV-3$_{PPA-F3}$ clones 6, 7, and 26, respectively. NS, nonspecific band. (D) Sequence analysis of the 424-bp-long RT-PCR product. The *gag* and *tax/rex* gels are representative of at least three different experiments performed on different RNA preparations. Numbers to the left of the blots are in base pairs.

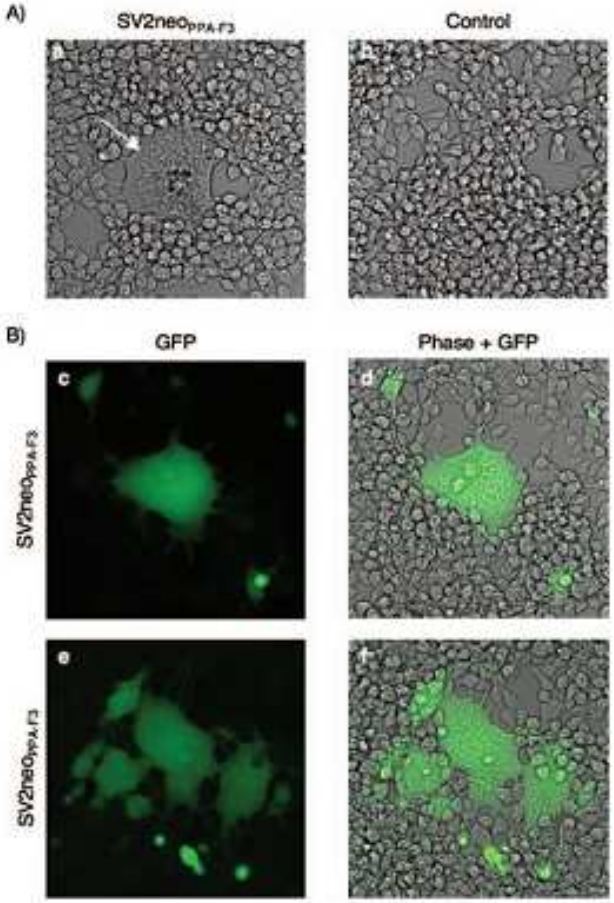


FIG. 4. Syncytium formation and Tax expression. (A) 293T cells were transiently transfected with (a) SV2neo$_{PPA-F3}$ or (b) the SV2neo empty vector. Forty-eight hours posttransfection, cell culture medium was removed, cells were washed with PBS and fixed, and pictures were taken with a Zeiss Axioplan-Axiocam-ApoTome system. (B, panels c to f) 293T-LTR-GFP cells were transiently transfected with SV2neo$_{PPA-F3}$. Forty-eight hours posttransfection, cells were processed as described above. (A and B) The images shown are representative of at least three different experiments.

pression of a functional Tax3 protein, indicator 293T–HTLV-1–LTR–GFP cells were transfected. Forty-eight hours later, a high number of fluorescent cells was observed (Fig. 4B, panels c to f), demonstrating that the Tax3 protein was expressed and functional. In most cases, the GFP signal was detected in cells that formed syncytia, confirming the expression of both the Env and Tax proteins within the same cells (Fig. 4B, panels d and f). As expected, neither the GFP signal nor syncytia were detected in the cells that had been transfected with the SV2neo backbone vector (data not shown).

SV2neo$_{PPA-F3}$ produces viral particles. SV2neo$_{PPA-F3}$-transfected 293T cells were observed by transmission electron microscopy to search for STLV-3$_{PPA-F3}$ viral particles. Microscope analysis revealed the presence of viral particles (Fig. 5a to c) whose sizes were not homogeneous (80 to 110 nm) and whose cores were of various densities, as previously reported for HTLV-1-infected cells (data not shown and reference 38), for cells transfected with an HTLV-2 molecular clone (data not shown), and for a short-term culture of STLV-3-infected cells (22). An envelope is visible in an enlarged image of Fig. 5a. These particles are very similar to those observed in MT2 cells or in 293T cells transfected with an HTLV-1 molecular clone (8, 42). As a control, 293T cells transfected with the SV2neo empty vector did not reveal the presence of any particle (Fig. 5d). Budding was also visible in SV2neo$_{PPA-F3}$-transfected 293T cells (Fig. 5e and f).

SV2neo$_{PPA-F3}$ viral particles are infectious. Finally, we wanted to determine whether SV2neo$_{PPA-F3}$ particles were or were not infectious. Even though the process is very inefficient, it is possible to infect cells with purified HTLV viruses (17, 18, 28, 42). To determine whether STLV-3$_{PPA-F3}$-transfected cells produce infectious particles, cell culture supernatant was collected from SV2neo$_{PPA-F3}$-transfected cells, purified, and added to 293T-LTR-GFP indicator cells. After several days of culture, a number of syncytia and of GFP-positive cells was observed (Fig. 6a to f). These results demonstrate that the purified STLV-3 particles are infectious. Thermal inactivation is commonly used as a means of efficiently inactivating retroviruses (45). As a control, the STLV-3$_{PPA-F3}$ virus-purified pellet was heated and added to the indicator cells. In that experiment, neither syncytia nor GFP-positive cells were observed (Fig. 6g and h).

DISCUSSION

The recent discovery of two HTLV-3 strains (7, 63) together with the demonstration of a number of key similarities between the Tax1 and Tax3 proteins (including the presence of a PDZ-binding domain) prompted us to wonder whether this new member of the HTLV group is pathogenic (6). Interestingly, Goubau et al. previously reported the immortalization of human cord blood cells after they were cocultivated with fresh peripheral blood mononuclear cells obtained from STLV-3-infected *Papio hamadryas* monkeys (22). However, until now, a transformed HTLV-3 cell line has not been available for such analysis. We and others have previously shown that HTLV-3 and STLV-3 share the same organization and are highly related in sequence (87 to 99% identity) (6, 11, 55). While the HTLV-3$_{3026ND}$ provirus from the Switzer laboratory has a length that is similar to those of Central African STLV-3 strains (8,917 bp for HTLV-3$_{3026ND}$ versus 8,919 bp for STLV-3$_{CTO-604}$ and 8,916 bp for STLV-3$_{PH969}$), we established that our isolate, HTLV-3$_{Py443}$, is shorter, with a 366-bp deletion in the pX-proximal region (6).

Several recent studies of the viral replication or persistence of wild-type or mutant HTLV-1 and HTLV-2 proviruses in vitro or in vivo have benefited from the availability of molecular clones (1, 4, 5, 13, 26, 46, 47, 64–66). Given the high percentage of identity between HTLV-3 and STLV-3 and because the 366-bp pX region that is present in the HTLV-3$_{Py443}$ genome deletion (6) seems to be uncommon among PTLV-3 strains, we decided to use an STLV-3 matrix to construct the first PTLV-3 molecular clone. Our construction technique relied on the sequential addition of defined amplified overlapping DNA fragments. Our present results demonstrate that, when transfected into 293T cells, the SV2neo$_{PPA-F3}$ molecular clone is transcribed and can direct the synthesis of viral pro-

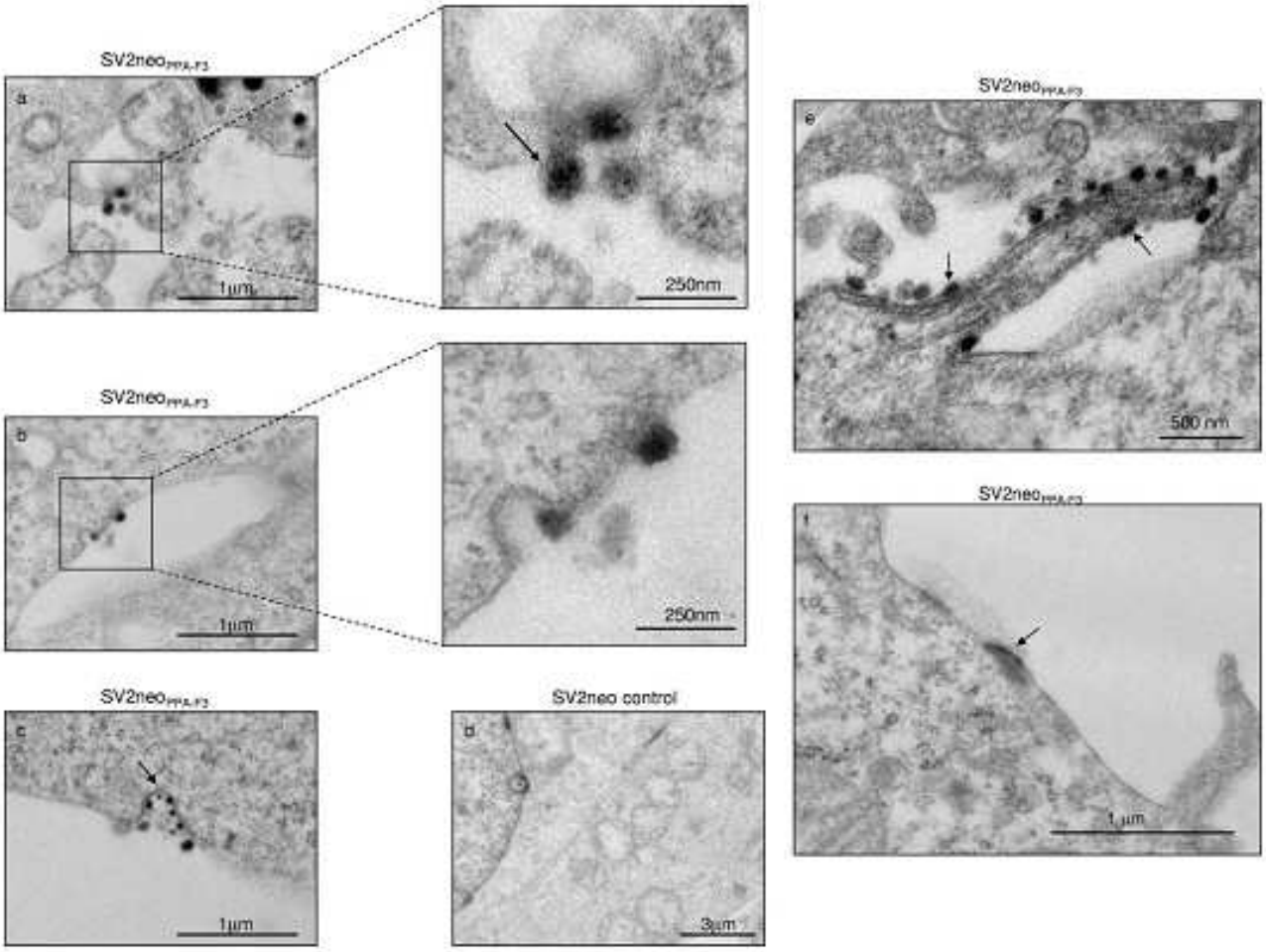


FIG. 5. Electron micrograph showing STLV-3 particles in transiently transfected cells. 293T-LTR-GFP cells were transfected with (a, b, c, e, f) SV2neo$_{PPA-F3}$ or (d) the SV2neo empty vector. Forty-eight hours posttransfection, cell culture medium was removed; the cells were washed with PBS and fixed for ultrastructural analyses as described in Materials and Methods. The images shown are representative of three separate experiments. The arrow in the enlarged area of panel a indicates the presence of an envelope.

teins that are able to assemble to form infectious viral particles as demonstrated by RT-PCR, Western blotting, immunofluorescence imaging, and electron microscopy.

We previously demonstrated that both human and simian Tax3 proteins can transactivate the heterologous HTLV-1 promoter in transient-transfection assays using Tax3 and HTLV-1 reporter plasmids (6, 11). Our current results demonstrate that these results are also true in the context of a genuine infection with an STLV-3 molecular clone that produces Tax3 protein in the infected cells. This suggests that this phenomenon could therefore occur in vivo in individuals dually infected with HTLV-1 and HTLV-3. Whether this would or would not accelerate the occurrence of a disease remains to be determined.

Apart from Tax and Rex, the presence of additional pX gene-encoded proteins in the genomes of STLV-3/HTLV-3 is a matter of debate (36, 37, 57). Apart from *tax* and *rex*, the STLV-3$_{PH969}$ strain was reported to contain at least two putative additional ORFs (RORFI and RORFII) (57). RORFII mRNA could be amplified from STLV-3$_{PH969}$-infected cells, while ORFI could not (57). Subsequently, however, Meertens et al. did not detect the presence of RORFII mRNA in two other STLV-3 samples (STLV-3$_{CTO-604}$ and STLV-3$_{PPA-F3}$) analyzed (36, 37). More recently, in silico analyses from Switzer and colleagues (55) allowed them to report the presence of two putative ORFs (ORFIII and ORFIV) in the HTLV-3 2026ND genome. The SV2neo$_{PPA-F3}$ clone will now give us the unique opportunity to study whether additional (accessory?) pX proteins are encoded by the STLV-3 genome. Similarly, we will now be able to evaluate whether, as is the case for HTLV-1 (20), the complementary strand of the STLV-3 RNA genome encodes a viral protein but also whether the Tax3 PDZ-binding domain that we previously described (11) has any role in vivo.

In conclusion, we have constructed the first PTLV-3 molecular clone. This clone is a unique tool that will now allow us to investigate in vivo the tropism of the STLV-3 virus, the immune response following infection, and the persistence of the virus. One of our next objectives is also to construct an infectious HTLV-3$_{Py843}$ molecular clone using the same approach. We have already determined that the 366-bp deletion has no effect on the Tax and Rex ORFs (6); nevertheless, one should

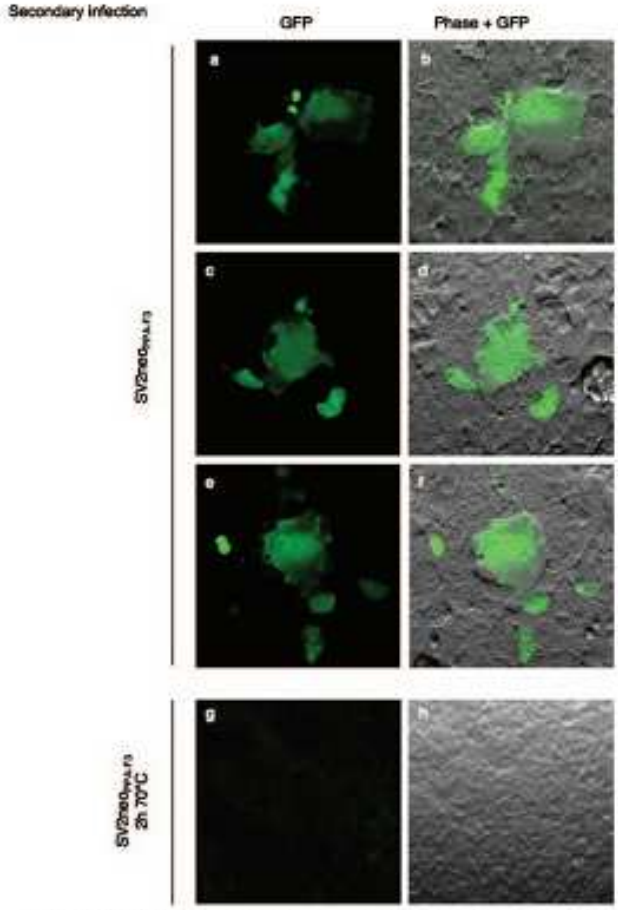


FIG. 6. SV2neo$_{PPA-F3}$ particles are infectious. 293T cells were transfected with SV2neo$_{PPA-F3}$. Forty-eight hours later, growth medium was collected, clarified, and filtered as described in the text. Virus was pelleted by centrifugation and resuspended in DMEM without fetal bovine serum in the presence of 10 μg/ml of DEAE-dextran. Complete medium was then added. One week later, live cells were visualized with a Zeiss Axioplan-Axiocam-ApoTome system (a to f). As a control (g, h), the viral pellet was heated at 70°C for 2 h before being added to the cells. The images shown are representative of two separate experiments.

determine whether this deletion has or does not have an impact on the viral life cycle.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by fellowships from le Ministère de la Recherche and La Fondation pour la Recherche Médicale to S.A.C. and from la Ligue Contre le Cancer to S.C. R.M. is supported by INSERM. Support from the Virus Cancer Prevention Association is also acknowledged.

We thank Pierre Charneau, Fatah Kashanchi, and Tim Stinear for their helpful comments, Patrick Green for the generous gift of the SV2neo and PH6neo plasmids, Pierre-Emmanuel Ceccaldi for the help with the HTLV-1-infected cells micrographs, and Joël Fagot for the STLV-3-infected blood samples.

REFERENCES

1. **Albrecht, B., N. D. Collins, M. T. Burniston, J. W. Nisbet, L. Ratner, P. L. Green, and M. D. Lairmore.** 2000. Human T-lymphotropic virus type 1 open reading frame I p12^{I} is required for efficient viral infectivity in primary lymphocytes. J. Virol. 74:9828–9835.
2. **Albrecht, B., and M. D. Lairmore.** 2002. Critical role of human T-lymphotropic virus type 1 accessory proteins in viral replication and pathogenesis. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 66:396–406.
3. **Anderson, M., and P. L. Green.** 2005. Growth and manipulation of a human T-cell leukemia virus type 2 full-length molecular clone. Methods Mol. Biol. 304:409–421.
4. **Arnold, J., B. Yamamoto, M. Li, A. J. Phipps, I. Younis, M. D. Lairmore, and P. L. Green.** 2006. Enhancement of infectivity and persistence in vivo by HBZ, a natural antisense coded protein of HTLV-1. Blood 107:3976–3982.
5. **Bartoe, J. T., B. Albrecht, N. D. Collins, M. D. Robek, L. Ratner, P. L. Green, and M. D. Lairmore.** 2000. Functional role of pX open reading frame II of human T-lymphotropic virus type 1 in maintenance of viral loads in vivo. J. Virol. 74:1094–1100.
6. **Calattini, S., S. A. Chevalier, R. Duprez, P. Afonso, A. Froment, A. Gessain, and R. Mahieux.** 2006. Human T-cell lymphotropic virus type 3: complete nucleotide sequence and characterization of the human Tax3 protein. J. Virol. 80:9876–9888.
7. **Calattini, S., S. A. Chevalier, R. Duprez, S. Bassot, A. Froment, R. Mahieux, and A. Gessain.** 2005. Discovery of a new human T-cell lymphotropic virus (HTLV-3) in Central Africa. Retrovirology 2:30.
8. **Ceccaldi, P. E., F. Delebecque, M. C. Prevost, A. Moris, J. P. Abastado, A. Gessain, O. Schwartz, and S. Orden.** 2006. DC-SIGN facilitates fusion of dendritic cells with human T-cell leukemia virus type 1-infected cells. J. Virol. 80:4771–4780.
9. **Chen, I. S., J. McLaughlin, J. C. Gasson, S. C. Clark, and D. W. Golde.** 1983. Molecular characterization of genome of a novel human T-cell leukaemia virus. Nature 305:502–505.
10. **Chevalier, S. A., L. Meertens, S. Calattini, A. Gessain, L. Kiemer, and R. Mahieux.** 2005. Presence of a functional but dispensable nuclear export signal in the HTLV-2 Tax protein. Retrovirology 2:70.
11. **Chevalier, S. A., L. Meertens, C. Pise-Masison, S. Calattini, H. Park, A. A. Alhaj, M. Zhou, A. Gessain, F. Kashanchi, J. N. Brady, and R. Mahieux.** 2006. The tax protein from the primate T-cell lymphotropic virus type 3 is expressed in vivo and is functionally related to HTLV-1 Tax rather than HTLV-2 Tax. Oncogene 25:4470–4482.
12. **Ciminale, V., G. N. Pavlakis, D. Derse, C. P. Cunningham, and B. K. Felber.** 1992. Complex splicing in the human T-cell leukemia virus (HTLV) family of retroviruses: novel mRNAs and proteins produced by HTLV type 1. J. Virol. 66:1737–1745.
13. **Collins, N. D., G. C. Newbound, B. Albrecht, J. L. Beard, L. Ratner, and M. D. Lairmore.** 1998. Selective ablation of human T-cell lymphotropic virus type 1 p121 reduces viral infectivity in vivo. Blood 91:4701–4707.
14. **Delamarre, L., A. R. Rosenberg, C. Pique, D. Pham, and M. C. Dokhelar.** 1997. A novel human T-leukemia virus type 1 cell-to-cell transmission assay permits definition of SU glycoprotein amino acids important for infectivity. J. Virol. 71:259–266.
15. **Delebecque, F., K. Pramberger, M. C. Prevost, M. Brahic, and F. Tangy.** 2002. A chimeric human T-cell lymphotropic virus type 1 with the envelope glycoprotein of Moloney murine leukemia virus is infectious for murine cells. J. Virol. 76:7883–7889.
16. **Derse, D., S. A. Hill, P. A. Lloyd, H. Chung, and B. A. Morse.** 2001. Examining human T-lymphotropic virus type 1 infection and replication by cell-free infection with recombinant virus vectors. J. Virol. 75:8461–8468.
17. **Derse, D., J. Mikovits, M. Polianova, B. K. Felber, and F. Ruscetti.** 1995. Virions released from cells transfected with a molecular clone of human T-cell leukemia virus type 1 give rise to primary and secondary infections of T cells. J. Virol. 69:1907–1912.
18. **Derse, D., J. Mikovits, and F. Ruscetti.** 1997. X-I and X-II open reading frames of HTLV-I are not required for virus replication or for immortalization of primary T-cells in vitro. Virology 237:123–128.
19. **Derse, D., J. Mikovits, D. Waters, S. Brining, and F. Ruscetti.** 1996. Examining the molecular genetics of HTLV-1 with an infectious molecular clone of the virus and permissive cell culture systems. J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol. 12:1–5.
20. **Gaudray, G., F. Gachon, J. Basbous, M. Biard-Piechaczyk, C. Devaux, and J. M. Mesnard.** 2002. The complementary strand of the human T-cell leukemia virus type 1 RNA genome encodes a bZIP transcription factor that down-regulates viral transcription. J. Virol. 76:12813–12822.
21. **Ghez, D., Y. Lepelletier, S. Lambert, J. M. Fourneau, V. Blot, S. Janvier, B. Arnulf, P. M. van Endert, N. Heveker, C. Pique, and O. Hermine.** 2006. Neuropilin-1 is involved in human T-cell lymphotropic virus type 1 entry. J. Virol. 80:6844–6854.
22. **Goubau, P., M. Van Brussel, A. M. Vandamme, H. F. Liu, and J. Desmyter.** 1994. A primate T-lymphotropic virus, PTLV-L, different from human T-lymphotropic viruses types I and II, in a wild-caught baboon (Papio hamadryas). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:2848–2852.
23. **Green, P. L., T. M. Ross, I. S. Chen, and S. Pettiford.** 1995. Human T-cell leukemia virus type II nucleotide sequences between *env* and the last exon of *tax/rex* are not required for viral replication or cellular transformation. J. Virol. 69:387–394.
24. **Green, P. L., Y. M. Xie, and I. S. Chen.** 1990. The internal methionine codons

of human T-cell leukemia virus type II *rex* gene are not required for p24^{rx} production or virus replication and transformation. J. Virol. 64:4914–4921.
25. **Gao, H. G., F. Wong-Staal, and R. C. Gallo.** 1984. Novel viral sequences related to human T-cell leukemia virus in T cells of a seropositive baboon. Science 223:1195–1197.
26. **Hiraragi, H., S. J. Kim, A. J. Phipps, M. Silic-Benussi, V. Ciminale, L. Ratner, P. L. Green, and M. D. Lairmore.** 2006. Human T-lymphotropic virus type 1 mitochondrion-localizing protein p13^{II} is required for viral infectivity in vivo. J. Virol. 80:3469–3476.
27. **Jassal, S. R., M. D. Lairmore, A. J. Leigh-Brown, and D. W. Brighty.** 2001. Soluble recombinant HTLV-1 surface glycoprotein competitively inhibits syncytia formation and viral infection of cells. Virus Res. 78:17–34.
28. **Jinno, A., Y. Haraguchi, H. Shiraki, and H. Hoshino.** 1999. Inhibition of cell-free human T-cell leukemia virus type 1 infection at a postbinding step by the synthetic peptide derived from an ectodomain of the gp21 transmembrane glycoprotein. J. Virol. 73:9683–9689.
29. **Jones, K. S., K. Fugo, C. Petrow-Sadowski, Y. Huang, D. C. Bertolette, I. Lisinski, S. W. Cushman, S. Jacobson, and F. W. Ruscetti.** 2006. Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2 use different receptor complexes to enter T cells. J. Virol. 80:8291–8302.
30. **Jones, K. S., C. Petrow-Sadowski, D. C. Bertolette, Y. Huang, and F. W. Ruscetti.** 2005. Heparan sulfate proteoglycans mediate attachment and entry of human T-cell leukemia virus type 1 virions into CD4$^+$ T cells. J. Virol. 79:12692–12702.
31. **Kim, F. J., N. Manel, Y. Boublik, J. L. Battini, and M. Sitbon.** 2003. Human T-cell leukemia virus type 1 envelope-mediated syncytium formation can be activated in resistant mammalian cell lines by a carboxy-terminal truncation of the envelope cytoplasmic domain. J. Virol. 77:963–969.
32. **Kimata, J. T., F. H. Wong, J. J. Wang, and L. Ratner.** 1994. Construction and characterization of infectious human T-cell leukemia virus type 1 molecular clones. Virology 204:656–664.
33. **Li, Q. X., D. Camerini, Y. Xie, M. Greenwald, D. R. Kuritzkes, and I. S. Chen.** 1996. Syncytium formation by recombinant HTLV-II envelope glycoprotein. Virology 218:279–284.
34. **Manel, N., F. J. Kim, S. Kinet, N. Taylor, M. Sitbon, and J. L. Battini.** 2003. The ubiquitous glucose transporter GLUT-1 is a receptor for HTLV. Cell 115:449–459.
35. **Meertens, L., S. Chevalier, R. Weil, A. Gessain, and R. Mahieux.** 2004. A 10-amino acid domain within HTLV-1 and HTLV-2 Tax protein sequences is responsible for their divergent subcellular localization. J. Biol. Chem. 279:43307–43320.
36. **Meertens, L., and A. Gessain.** 2003. Divergent simian T-cell lymphotropic virus type 3 (STLV-3) in wild-caught *Papio hamadryas papio* from Senegal: widespread distribution of STLV-3 in Africa. J. Virol. 77:782–789.
37. **Meertens, L., R. Mahieux, P. Mauclere, J. Lewis, and A. Gessain.** 2002. Complete sequence of a novel highly divergent simian T-cell lymphotropic virus from wild-caught red-capped mangabeys (*Cercocebus torquatus*) from Cameroon: a new primate T-lymphotropic virus type 3 subtype. J. Virol. 76:259–268.
38. **Miyauchi, M., and K. Maruyama.** 1990. Morphological and antigenic variations of human T cell leukemia virus type 1 particles in human lymphocytes. J. Electron Microsc. (Tokyo) 39:145–154.
39. **Nicot, C., T. Astier-Gin, E. Edouard, E. Legrand, D. Moynet, A. Vital, D. Londos-Gagliardi, J. P. Moreau, and B. Guillemain.** 1993. Establishment of HTLV-I-infected cell lines from French, Guianese and West Indian patients and isolation of a proviral clone producing viral particles. Virus Res. 30:317–334.
40. **Nicot, C., M. Dundr, J. M. Johnson, J. R. Fullen, N. Alonso, R. Fukumoto, G. L. Princler, D. Derse, T. Misteli, and G. Franchini.** 2004. HTLV-1-encoded p30II is a post-transcriptional negative regulator of viral replication. Nat. Med. 10:197–201.
41. **Nicot, C., R. L. Harrod, V. Ciminale, and G. Franchini.** 2005. Human T-cell leukemia/lymphoma virus type 1 nonstructural genes and their functions. Oncogene 24:6026–6034.
42. **Ohsugi, T., T. Kumasaka, and T. Urano.** 2004. Construction of a full-length human T cell leukemia virus type 1 genome from MT-2 cells containing multiple defective proviruses using overlapping polymerase chain reaction. Anal. Biochem. 329:281–288.
43. **Poiesz, B. J., F. W. Ruscetti, A. F. Gazdar, P. A. Bunn, J. D. Minna, and R. C. Gallo.** 1980. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:7415–7419.
44. **Poiesz, B. J., F. W. Ruscetti, M. S. Reitz, V. S. Kalyanaraman, and R. C. Gallo.** 1981. Isolation of a new type C retrovirus (HTLV) in primary uncultured cells of a patient with Sezary T-cell leukaemia. Nature 294:268–271.
45. **Quinnan, G. V., Jr., M. A. Wells, A. E. Wittek, M. A. Phelan, R. E. Mayner, S. Feinstone, R. H. Purcell, and J. S. Epstein.** 1986. Inactivation of human T-cell lymphotropic virus, type III by heat, chemicals, and irradiation. Transfusion 26:481–483.
46. **Robek, M. D., and L. Ratner.** 2000. Immortalization of T lymphocytes by human T-cell leukemia virus type 1 is independent of the Tax-CBP/p300 interaction. J. Virol. 74:11988–11992.
47. **Robek, M. D., F. H. Wong, and L. Ratner.** 1998. Human T-cell leukemia virus type 1 pX-I and pX-II open reading frames are dispensable for the immortalization of primary lymphocytes. J. Virol. 72:4458–4462.
48. **Seiki, M., S. Hattori, Y. Hirayama, and M. Yoshida.** 1983. Human adult T-cell leukemia virus: complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:3618–3622.
49. **Shimotohno, K., D. W. Golde, M. Miwa, T. Sugimura, and I. S. Chen.** 1984. Nucleotide sequence analysis of the long terminal repeat of human T-cell leukemia virus type II. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:1079–1083.
50. **Shimotohno, K., Y. Takahashi, N. Shimizu, T. Gojobori, D. W. Golde, I. S. Chen, M. Miwa, and T. Sugimura.** 1985. Complete nucleotide sequence of an infectious clone of human T-cell leukemia virus type II: an open reading frame for the protease gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3101–3105.
51. **Shimotohno, K., W. Wachsman, Y. Takahashi, D. W. Golde, M. Miwa, T. Sugimura, and I. S. Chen.** 1984. Nucleotide sequence of the 3′ region of an infectious human T-cell leukemia virus type II genome. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6657–6661.
52. **Silverman, L. R., A. J. Phipps, A. Montgomery, L. Ratner, and M. D. Lairmore.** 2004. Human T-cell lymphotropic virus type 1 open reading frame II-encoded p30II is required for in vivo replication: evidence of in vivo reversion. J. Virol. 78:3837–3845.
53. **Slamon, D. J., M. F. Press, L. M. Souza, D. C. Murdock, M. J. Cline, D. W. Golde, J. C. Gasson, and I. S. Chen.** 1985. Studies of the putative transforming protein of the type 1 human T-cell leukemia virus. Science 228:1427–1430.
54. **Slamon, D. J., K. Shimotohno, M. J. Cline, D. W. Golde, and I. S. Chen.** 1984. Identification of the putative transforming protein of the human T-cell leukemia viruses HTLV-I and HTLV-II. Science 226:61–65.
55. **Switzer, W. M., S. H. Qari, N. D. Wolfe, D. S. Burke, T. M. Folks, and W. Heneine.** 2006. Ancient origin and molecular features of the novel human T-lymphotropic virus type 3 revealed by complete genome analysis. J. Virol. 80:7427–7438.
56. **Takemura, T., M. Yamashita, M. K. Shimada, S. Ohkura, T. Shotake, M. Ikeda, T. Miura, and M. Hayami.** 2002. High prevalence of simian T-lymphotropic virus type L in wild Ethiopian baboons. J. Virol. 76:1642–1648.
57. **Van Brussel, M., P. Goubau, R. Rousseau, J. Desmyter, and A. M. Vandamme.** 1996. The genomic structure of a new simian T-lymphotropic virus, STLV-PH969, differs from that of human T-lymphotropic virus types I and II. J. Gen. Virol. 77:347–358.
58. **Van Dooren, S., L. Meertens, P. Lemey, A. Gessain, and A. M. Vandamme.** 2005. Full-genome analysis of a highly divergent simian T-cell lymphotropic virus type 1 strain in Macaca arctoides. J. Gen. Virol. 86:1953–1959.
59. **Van Dooren, S., V. Shanmugam, V. Bhullar, B. Parekh, A. M. Vandamme, W. Heneine, and W. M. Switzer.** 2004. Identification in gelada baboons (Theropithecus gelada) of a distinct simian T-cell lymphotropic virus type 3 with a broad range of Western blot reactivity. J. Gen. Virol. 85:507–519.
60. **Vincent, M. J., F. J. Novembre, V. F. Yanoschikov, H. M. McClure, and R. W. Compans.** 1996. Characterization of a novel baboon virus closely resembling human T-cell leukemia virus. Virology 226:57–65.
61. **Wang, B., M. G. Agadjanyan, V. Srikantan, K. E. Ugen, W. Hall, M. H. Kaplan, K. Dang, W. V. Williams, and D. B. Weiner.** 1993. Molecular cloning, expression, and biological characterization of an HTLV-II envelope glycoprotein: HIV-1 expression is permissive for HTLV-II-induced cell fusion. AIDS Res. Hum. Retrovir. 9:849–860.
62. **Wirtz, R., and M. Lochelt.** 2005. Construction and analysis of genomic, full-length infectious foamy virus DNA clones. Methods Mol. Biol. 304:423–434.
63. **Wolfe, N. D., W. Heneine, J. K. Carr, A. D. Garcia, V. Shanmugam, U. Tamoufe, J. N. Torimiro, A. T. Prosser, M. Lebreton, E. Mpoudi-Ngole, F. E. McCutchan, D. L. Birx, T. M. Folks, D. S. Burke, and W. M. Switzer.** 2005. Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:7994–7999.
64. **Xie, L., B. Yamamoto, A. Haoudi, O. J. Semmes, and P. L. Green.** 2006. PDZ binding motif of HTLV-1 Tax promotes virus-mediated T-cell proliferation in vitro and persistence in vivo. Blood 107:1980–1988.
65. **Ye, J., L. Xie, and P. L. Green.** 2003. Tax and overlapping Rex sequences do not confer the distinct transformation tropisms of human T-cell leukemia virus types 1 and 2. J. Virol. 77:7728–7735.
66. **Younis, I., B. Yamamoto, A. Phipps, and P. L. Green.** 2005. Human T-cell leukemia virus type 1 expressing nonoverlapping Tax and Rex genes replicates and immortalizes primary human T lymphocytes but fails to replicate and persist in vivo. J. Virol. 79:14473–14481.
67. **Zemba, M., A. Alke, J. Bodem, I. G. Winkler, R. L. Flower, K. Pfrepper, H. Delius, R. M. Flugel, and M. Lochelt.** 2000. Construction of infectious feline foamy virus genomes: cat antisera do not cross-neutralize feline foamy virus chimera with serotype-specific Env sequences. Virology 266:150–156.
68. **Zhao, T. M., M. A. Robinson, F. S. Bowers, and T. J. Kindt.** 1995. Characterization of an infectious molecular clone of human T-cell leukemia virus type 1. J. Virol. 69:2024–2030.

NOTES