



**HAL**  
open science

# Caractérisation fonctionnelle des interactions virus-kinases lors de l'entrée cellulaire du virus de l'hépatite C

Laetitia Zona

► **To cite this version:**

Laetitia Zona. Caractérisation fonctionnelle des interactions virus-kinases lors de l'entrée cellulaire du virus de l'hépatite C. Sciences agricoles. Université de Strasbourg, 2013. Français. NNT : 2013STRAJ007. tel-00870549

**HAL Id: tel-00870549**

**<https://theses.hal.science/tel-00870549v1>**

Submitted on 7 Oct 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 DE STRASBOURG



*ÉCOLE DOCTORALE 414, ED des Sciences de la Vie et de la Santé  
Inserm UMR 1110*

## THÈSE

présentée par :

**Laetitia ZONA**

soutenue le : 4 mars 2013

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : **Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie /**

**Option Biologie Cellulaire et Virologie**

# Caractérisation fonctionnelle des interactions virus-kinases lors de l'entrée cellulaire du virus de l'hépatite C

THÈSE dirigée par :

M. BAUMERT Thomas F.

Pr, PU-PH, Inserm U1110, Unistra, Strasbourg

RAPPORTEURS :

M. SUREAU Camille

Pr, DR, HDR, INTS, Paris

M. HILDT Eberhardt

Pr, DR, Paul-Ehrlich Institut, Langen, Allemagne

AUTRE MEMBRE DU JURY :

Mme FRIANT Sylvie

Dr, CR, HDR, UMR7156 CNRS, Unistra, Strasbourg

## REMERCIEMENTS

*Au terme de ce travail, c'est avec émotion que je tiens à remercier tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ma thèse. En trois ans, je suis passée de l'enthousiasme d'initier un nouveau projet, aux doutes et au découragement face aux nombreuses difficultés et enfin à la satisfaction de le voir progresser et évoluer.*

*Je tiens tout d'abord à adresser mes remerciements les plus sincères à mon directeur de thèse, le Professeur Thomas Baumert, pour m'avoir accueillie au sein de son équipe, m'avoir donnée ma chance me permettant de réaliser ma thèse dans les meilleures conditions. J'espère avoir été digne de la confiance qu'il m'a accordée et que ce travail est finalement à la hauteur de ses espérances. J'ai beaucoup appris à ses côtés et je lui adresse ma gratitude pour tout cela.*

*Je désire grandement remercier Joachim, mon superviseur, qui m'a choisie sur ce projet et m'a fait confiance tout au long de ces trois années. Son encadrement, ses remarques, son ouverture d'esprit et sa bonne humeur sont autant d'éléments qui m'ont permis d'atteindre les objectifs de mon travail de doctorat. Je le remercie pour tout cela.*

*J'adresse de chaleureux remerciements à Mirjam pour son attention de tout instant sur mes travaux, ses conseils avisés et son énergie qui ont été des éléments moteurs pour moi. J'ai pris grand plaisir à travailler avec elle.*

*Je remercie les membres de mon jury, C. Sureau, E. Hildt et S. Friant, d'avoir accepté de juger ma thèse et pour l'intérêt qu'ils portent à mon travail.*

*Un merci tout particulier à Alizé, Marine et Isabel pour l'aide inconditionnelle qu'elles m'ont apportée, tant au labo qu'en dehors, mais aussi pour leurs encouragements, nos rires et bien plus encore ! Merci à Catherine S. pour son soutien sans faille. Je désire aussi remercier tous les membres de mon équipe, et je pense surtout à toi Christine, pour leur sympathie et leur amitié. J'ai eu beaucoup de plaisir à travailler avec eux. Je souhaite encore remercier nos supers 'techs' Charlotte, Laura et Sarah pour l'aide qu'elles m'ont donnée à des moments importants de ma thèse.*

*Je tiens à adresser mes remerciements à Catherine C., Sigis, Dominique et Patricia pour leur appui et leur humour et également à Anne qui a grandement facilité mes démarches administratives.*

*Je tiens à remercier tous les membres de l'U748/1110 de m'avoir supportée, pour nos discussions et leur bonne volonté. Merci Rajeev, Roxane, Fei, Dan, Catherine F., Mathieu, Lamine, Emilie, Marie, Tao, Eric. Nous avons partagé de bons moments. S'il y a des personnes que je n'ai pas citées, je les remercie sincèrement pour leur aide précieuse.*

*La réussite de ce projet de thèse est également due aux différents collaborateurs qui ont travaillé sur les projets / papiers, ainsi qu'aux cliniciens.*

*Mes remerciements s'adressent enfin à mes parents, Lionel, ma famille et mes ami(e)s qui m'ont toujours épaulée, non seulement dans ce projet, mais aussi au quotidien. Merci de m'avoir soutenue et encouragée ! Il m'est impossible de trouver des mots pour dire à quel point je les aime. J'aurais eu du mal à terminer ce travail sans le soutien engagé de Lionel. Je te dois beaucoup...*

# TABLE DES MATIERES

## INTRODUCTION

<b>I. L'infection par le virus de l'hépatite C</b>	<b>8</b>
1. Epidémiologie et manifestations cliniques de l'infection par le HCV	8
2. Transmission du virus	10
3. Traitement de l'infection chronique par le HCV	10
<b>II. Le virus de l'hépatite C</b>	<b>12</b>
1. Organisation génomique du HCV	12
2. L'hétérogénéité du virus	20
<b>III. Les modèles d'étude du HCV</b>	<b>21</b>
1. Les modèles <i>ex vivo</i> et <i>in vitro</i>	22
2. Les modèles animaux <i>in vivo</i>	27
<b>IV. Les facteurs de l'hôte requis pour l'entrée du HCV</b>	<b>30</b>
1. Les facteurs d'attachement	30
2. Les facteurs d'entrée	33
3. Les co-facteurs	39
<b>V. Le cycle viral</b>	<b>48</b>
1. Attachement et entrée	48
2. Traduction et réplication	50
3. Assemblage et sécrétion des virions	51
4. Transmission de cellule à cellule	52
<b>VI. Les voies de signalisation de l'EGFR</b>	<b>52</b>
1. La voie PI3K/Akt	54
2. La voie STAT	55
3. Les voies des MAPK	55
<b>VII. Le virus de l'hépatite C, l'EGFR et les voies de signalisation</b>	<b>58</b>
1. La protéine core	58
2. La protéine NS3	59
3. La protéine NS5A	59
4. La protéine NS5B	60

## **RESULTATS**

<i>I. Partie 1: Mécanismes moléculaires dépendants de l'EGFR et de l'EphA2 lors de l'entrée du HCV</i> -----	63
1. Les RTK de l'hôte sont des co-facteurs d'entrée du HCV -----	63
2. Des ligands spécifiques aux RTK modulent l'entrée du HCV -----	64
3. Des anticorps dirigés contre les RTK modulent l'entrée du HCV -----	68
<i>II. Partie 2: La transduction du signal par HRas joue un rôle dans l'entrée du HCV dans la cellule, en déclenchant l'assemblage du complexe de récepteur tétraspanine de l'hôte</i> -----	71

## **DISCUSSION et CONCLUSION**

<i>I. L'EGFR et l'EphA2 sont des co-facteurs d'entrée du HCV</i> -----	102
<i>II. HRas régule la diffusion membranaire et la mobilité de CD81 et déclenche le ré-arrangement des TEM et la formation du complexe de facteurs d'entrée du HCV</i> ---	104
<i>III. Perspectives</i> -----	106

## **BIBLIOGRAPHIE**

## **ANNEXE**

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

**Figure 1:** La prévalence du virus de l'hépatite C dans le monde

**Figure 2:** Représentation schématique du HCV

**Figure 3:** Organisation génomique du HCV

**Figure 4:** Représentation schématique de la production des HCVpp

**Figure 5:** Structure d'un monomère de l'EGFR

**Figure 6:** Les ligands de l'EGFR

**Figure 7:** Caractéristiques générales des récepteurs Eph et éphrines

**Figure 8:** Modèle d'entrée du HCV

**Figure 9:** Représentation schématique des principaux sites d'autophosphorylation de l'EGFR et des molécules de signalisation associés à ces sites

**Figure 10:** Les voies de signalisation principales de l'EGFR

**Figure 11:** La plupart des RTK active les GTPases Ras

**Figure 12:** Signalisation en amont de la GTPase Ras

**Figure 13:** Modulation de l'entrée du HCV par des ligands de l'EGFR

**Figure 14:** Modulation de l'entrée du HCV par un ligand contrôle, le TGF- $\beta$

**Figure 15:** Modulation de l'entrée du HCV par des ligands de l'EGFR et un inhibiteur

**Figure 16:** Des ligands spécifiques d'EphA2 modulent l'entrée du HCV

**Figure 17:** Modulation de l'entrée du HCV par des anticorps spécifiques de l'EGFR

**Figure 18:** Modulation de l'entrée du HCV par le mAb spécifique de l'EGFR

**Figure 19:** Modulation de l'entrée du HCV par des anticorps spécifiques de l'EGFR

**Figure 20:** Des anticorps spécifiques d'EphA2 modulent l'entrée du HCV

## ABREVIATIONS

<b>aa</b>	acides aminés
<b>ADAM</b>	a disintegrin and metalloproteinase
<b>AP-1</b>	activator protein 1
<b>apoE</b>	apolipoprotéine E
<b>ARFP</b>	alternate reading frame protein
<b>ASK1</b>	apoptosis signal-regulating kinase 1
<b>Cbl</b>	casitas B-lineage lymphoma oncogene
<b>Cdc42</b>	cycle de division cellulaire 42
<b>CEBSC</b>	centre européen de biologie et de génomique structurale
<b>CLDN1</b>	claudine-1
<b>c-Src</b>	cellular sarcoma protein
<b>CypA</b>	cyclophiline A
<b>DAA</b>	substances antivirales directes
<b>DLK</b>	dual leucine zipper-bearing kinase
<b>EGFR</b>	récepteur du facteur de croissance épidermique
<b>EphA2</b>	récepteur de l'éphrine A2
<b>Eps15</b>	EGFR pathway substrate 15
<b>Fah</b>	fumaryl acetoacetate hydrolase
<b>FAK</b>	kinase d'adhésion focale
<b>FDA</b>	food and drug administration
<b>FFU</b>	focus-forming unit
<b>FRET</b>	fluorescence resonance energy transfert
<b>GAG</b>	glycosaminoglycanes
<b>GFP</b>	green fluorescent protein
<b>Grb2</b>	Growth factor receptor-bound protein 2
<b>HB-EGF</b>	heparin-binding EGF
<b>HBV</b>	virus de l'hépatite B
<b>HCC</b>	carcinome hépatocellulaire
<b>HCV</b>	virus de l'hépatite C
<b>HCVcc</b>	particules recombinantes du HCV adaptées en culture cellulaire
<b>HCVpp</b>	pseudoparticules du HCV
<b>HDL</b>	lipoprotéines de haute densité
<b>HIV</b>	virus de l'immunodéficience humaine
<b>HS</b>	héparanes sulfates
<b>HTA</b>	agents ciblant l'hôte
<b>HVR</b>	régions hypervariables
<b>IFITM1</b>	interferon-induced transmembrane protein 1
<b>IFN-<math>\alpha</math></b>	interféron-alpha
<b>IGBMC</b>	institut de génétique et de biologie moléculaire et cellulaire
<b>IL-2R<math>\gamma</math></b>	$\gamma$ -chain of the receptor for IL-2
<b>IRES</b>	internal ribosome entry site
<b>IRF9</b>	IFN regulatory factor 9

<b>ISG</b>	interferon-stimulated gene
<b>ITGB1</b>	intégrine beta 1
<b>Jak</b>	Janus kinase
<b>JNK</b>	c-Jun terminal kinase
<b>LDL</b>	lipoprotéines de faible densité
<b>LDLR</b>	récepteur des lipoprotéines de faible densité
<b>LPS</b>	lipopolysaccharide
<b>MAP3K</b>	MAPK kinase kinases
<b>MAPK</b>	mitogen-activated protein kinase
<b>MEK</b>	mitogen-activated ERK kinase
<b>MKKS</b>	mitogen-activated protein kinase kinase
<b>MLK-2</b>	mixed-lineage kinase-2
<b>MLV</b>	virus de la leucémie murine
<b>MTK1</b>	MAP three kinase 1
<b>nAb</b>	anticorps neutralisants
<b>NPC1L1</b>	récepteur Niemann-Pick C1 Like 1
<b>OCLN</b>	occludine
<b>ORF</b>	cadre ouvert de lecture
<b>pAb</b>	anticorps polyclonaux
<b>PDGFR</b>	platelet-derived growth factor recepto
<b>PDK1</b>	phosphoinositide-dependent kinase 1
<b>PDZ</b>	post synaptic density protein (PSD95), Drosophila disc large tumor suppressor (Dlg1) and zonula occludens-1 protein (Zo-1)
<b>PH</b>	pleckstrin homology
<b>PHH</b>	hépatocytes primaires humains
<b>PI3K</b>	phosphatidylinositol 3-kinase
<b>PI4KIII<math>\alpha</math></b>	phosphatidylinositol 4-kinase III alpha
<b>PKA</b>	protéine kinase A
<b>PKB</b>	protéine kinase B
<b>PKC</b>	protéine kinase C
<b>PKI</b>	protein kinase inhibitor
<b>PLCy</b>	phospholipase Cy
<b>PTB</b>	phospho tyrosine binding
<b>Rag2</b>	recombination activating gene 2
<b>Ras</b>	rat sarcoma
<b>RE</b>	réticulum endoplasmique
<b>RFP</b>	red fluorescent protein
<b>RNAi</b>	ARN interférant
<b>RTK</b>	récepteurs à tyrosine kinase
<b>SAM</b>	sterile alpha motif
<b>SCID</b>	Severe Combined Immunodeficiency
<b>SH2</b>	Src Homology 2
<b>SOC</b>	traitement actuel
<b>SR-BI</b>	récepteur scavenger de classe B de type I



<b>STAT</b>	signal transducer and activator of transcription
<b>Sos</b>	son of sevenless
<b>SVR</b>	réponse virologique soutenue
<b>TAK1</b>	transforming growth factor-activated kinase 1
<b>TCA</b>	transfected cell array
<b>TCID<sub>50</sub></b>	50% tissue culture infective dose
<b>TC-PT</b>	T cell protein tyrosine phosphatase
<b>TEM</b>	microdomaine enrichi en tétraspanines
<b>TGF<math>\alpha</math></b>	transforming growth factor $\alpha$
<b>TJ</b>	jonctions serrées
<b>TLR</b>	Toll like receptor
<b>UTR</b>	régions non traduites
<b>VLDL</b>	lipoprotéines de très faible densité
<b>VLP</b>	virus-like particules

L'infection par le virus de l'hépatite C (HCV) représente un problème majeur de santé publique mondial. Le HCV est le seul membre du genre des *hepacivirus* au sein de la famille des *Flaviviridae*, qui compte comme autres membres les *flavivirus* (virus de la dengue, de la fièvre jaune...) et les *pestivirus* (diarrhée bovine virale, virus de la peste porcine...). Le HCV infecte principalement les hépatocytes et a un tropisme d'espèce restreint au chimpanzé et à l'Homme. Un diagnostic précoce est difficile à mettre en œuvre car l'infection aiguë est généralement asymptomatique et conduit souvent à une infection chronique. Le taux de progression de la maladie varie selon les individus, mais prend généralement 15-20 ans à se développer, avec un risque de cancer du foie de 5% par an.

L'infection chronique par le HCV est une indication majeure de transplantation hépatique en Europe et aux États-Unis. En dépit de tout traitement, la réinfection du greffon se produit de manière systématique chez tous les patients transplantés.

Aucun vaccin protégeant contre une infection par le HCV n'est disponible actuellement. Bien que de nouveaux antiviraux aient été approuvés récemment en Europe et aux États-Unis, les thérapies antivirales actuelles sont toujours caractérisées par une efficacité limitée, des coûts élevés et des effets secondaires importants. Ainsi, le développement de nouvelles stratégies anti-HCV reste un défi. Le manque de données sur les mécanismes impliqués lors de l'infection par le HCV a longtemps été, et demeure encore, un obstacle quant à l'élaboration de nouveaux traitements pour combattre cette maladie.

Mes travaux de thèse présentés dans ce manuscrit se sont tout d'abord intéressés à la découverte de nouveaux récepteurs d'entrée du HCV dans le kinome humain, ce qui nous a ensuite mené à étudier les mécanismes moléculaires des voies de signalisation impliquées dans l'entrée du HCV dans les cellules hôtes. Ces travaux ouvrent la voie sur de nouvelles cibles thérapeutiques afin de combattre l'infection par le HCV. Après une synthèse bibliographique de l'état actuel des connaissances concernant le HCV, les résultats originaux émanant de nos travaux sont présentés sous forme d'articles scientifiques d'ores et déjà acceptés ou soumis à la publication; finalement, la dernière partie de ce manuscrit est consacrée à la discussion et présente les perspectives liées à ce sujet.

## **INTRODUCTION**

### **I. L'infection par le virus de l'hépatite C**

#### **1. Epidémiologie et manifestations cliniques de l'infection par le HCV**

Le foie est le plus grand organe du corps humain; il pèse entre 1,2 et 1,5 kg et a un rôle central dans les voies métaboliques, endocriniennes et sécrétoires, y compris dans le stockage, le transport et la synthèse des lipides (Taub, 2004). Les cellules principales du foie, qui effectuent la plupart de ses fonctions, sont les hépatocytes qui représentent 80% de la masse totale du foie.

Le virus de l'hépatite C (HCV) a été identifié pour la première fois par Michael Houghton et son équipe en 1989 comme hépatite non-A non-B infectant le foie (Choo et al., 1989). Avec 170 millions de personnes infectées à travers le monde (3% de la population mondiale), soit 3 à 4 millions d'infections par an, le HCV est la deuxième cause d'hépatite dans le monde, après le virus de l'hépatite B (HBV) (Shepard et al., 2005; Thomas and Zoulim, 2012). L'infection par le HCV résulte en une hépatite aiguë qui peut se résoudre spontanément dans environ 20% des cas ou peut se transformer en une hépatite chronique dans environ 80% des cas.

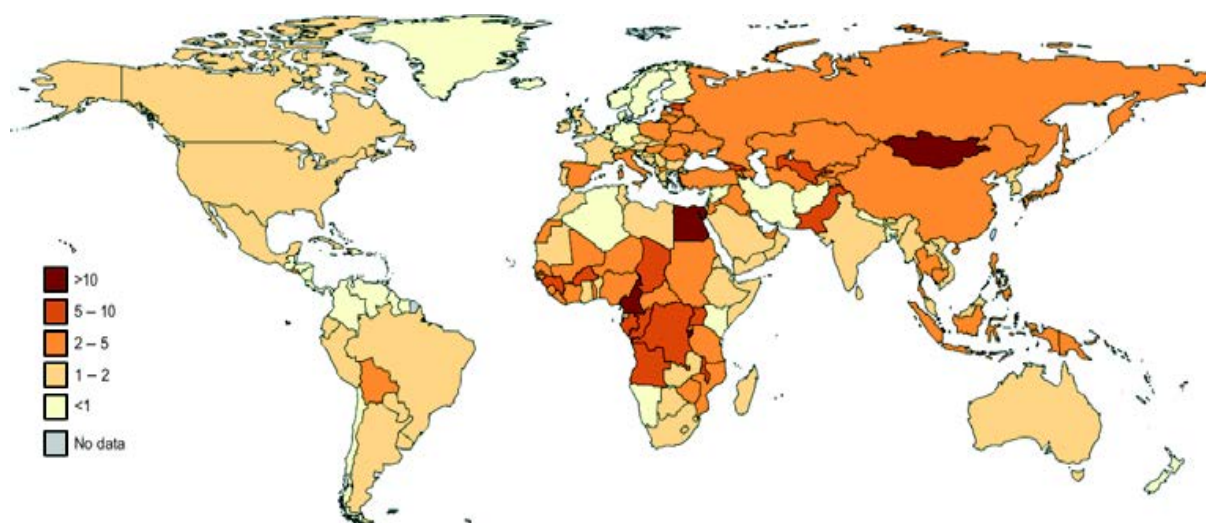
**L'hépatite aiguë** est le plus souvent asymptomatique et n'est donc pas diagnostiquée fréquemment. Elle reste sans réel danger pour la santé. Seul 15 à 30% des patients infectés en phase aiguë présentent des signes cliniques qui apparaissent habituellement entre 2 et 26 semaines après l'infection (Lauer and Walker, 2001). L'infection symptomatique aiguë implique l'apparition de symptômes non spécifiques tels que malaise, léthargie, jaunisse et nausée. On observe aussi chez les patients une augmentation au niveau du foie des enzymes sériques comme l'alanine aminotransférase et l'aspartate aminotransférase, premier signe de blessure hépatique (Grebely et al., 2011). L'hépatite fulminante menant à la mort brutale est rare; elle est observée chez moins de 1% des patients.

Après l'infection initiale, le HCV peut persister chez environ 80% des individus, malgré la présence d'immunité cellulaire et humorale. Une réponse spécifique dirigée contre le HCV peut être développée, après 5 à 9 semaines d'infection. Des lymphocytes T spécifiques au HCV émergent et jouent un rôle dans le contrôle du virus et les lésions du foie (Zeisel et al., 2008). Ces cellules T CD8+ spécifiques attaquent les hépatocytes infectés, ce qui induit une hépatite

(Hiroishi et al., 2008). D'autre part, des anticorps neutralisants (nAb) reconnaissent directement le virus circulant dans le sérum et l'inactivent. Les nAb préviennent l'attachement viral, interfèrent avec l'interaction entre le virus et les récepteurs cellulaires et bloquent l'entrée ou des étapes suivant l'attachement du virus, comme la fusion membranaire (Haberstroh et al., 2008). Ils peuvent être détectés aussi bien en phase aiguë que chronique de l'infection et ne sont pas forcément synonyme de clairance virale (Pestka et al., 2007). Il est important de noter que des réponses immunitaires cellulaires et humorales fortes et multispécifiques au cours de la phase aiguë de la maladie ont été associées à la guérison de l'infection par le HCV (Pestka et al., 2007; Takaki et al., 2000). Les réponses immunitaires cellulaires et humorales sont cependant, pour la majorité des individus, insuffisantes pour atteindre la clairance virale au cours de la phase aiguë et l'infection évolue vers la maladie chronique (Pestka et al., 2007; Takaki et al., 2000; von Hahn et al., 2007).

Dans le cas de **l'hépatite chronique**, la progression de la maladie est lente, entre 10 et 25 ans (Lauer and Walker, 2001). L'hépatite chronique est définie par la présence d'ARN du HCV détectable 6 mois après le moment estimé de l'infection. Pour la majorité des patients atteints par le HCV, l'évolution vers une maladie chronique est associée à un risque accru de maladies du foie dans 20 à 30% des cas (fibrose, cirrhose) et de carcinome hépatocellulaire (HCC) dans 2,5 % des cas (Alter, 2007). Le HCC est classé cinquième cancer le plus fréquent et troisième cause la plus fréquente de décès par cancer dans le monde (Hatzakis et al., 2011).

La distribution géographique des personnes infectées par le HCV dans le monde est hétérogène (Figure 1). En effet, la prévalence la plus faible a été enregistrée au Royaume-Uni et en Scandinavie (0,01%-0,1%) et l'Égypte est le pays affichant la plus forte prévalence (15%-20%) (Alter, 2007). Les estimations actuelles de prévalence sont de 400.000 sujets chroniquement infectés en Australie et Océanie, 14 millions en Amériques, 16 millions dans le Moyen-Orient, 17,5 millions en Europe, 28 millions en Afrique et 83 millions en Asie (Lavanchy, 2011). En Europe, les patients chroniquement infectés par le HCV sont 10 fois plus nombreux que les personnes infectées par le virus de l'immunodéficience humaine (HIV) comptabilisée à 1,5 millions (Hatzakis et al., 2011). Par ailleurs, il est à noter que le HCV est dix fois plus infectieux que le HIV (Hatzakis et al., 2011). En France, on considère qu'environ 600.000 personnes sont porteuses du HCV, soit 1 % de la population.



**Figure 1: La prévalence du virus de l'hépatite C dans le monde** (Source: (Lavanchy, 2011)).

## 2. Transmission du virus

Le HCV est un virus transmissible par le sang. Avant les années 1980, la voie de transmission principale était l'exposition au sang ou à des produits sanguins contaminés. Après l'établissement du criblage des échantillons sanguins, cette voie de transmission a presque été complètement éradiquée dans les pays développés (Lauer and Walker, 2001). De nos jours, la principale voie de contamination du HCV est la transmission par voie intraveineuse des utilisateurs de drogues, ainsi que lors d'actes culturels ou religieux comme piercing, tatouage, circoncision et acupuncture (Thomas and Zoulim, 2012). Pour les pays en voie de développement, vient s'ajouter à cette voie la ré-utilisation du matériel médical contaminé (Lavanchy, 2009). Le HCV peut aussi se transmettre de manière périnatale (transmission verticale), de la mère infectée à son enfant, mais il est surtout associé à la co-infection avec le HIV de la mère (Lauer and Walker, 2001). Finalement, il a été suggéré que le HCV pourrait être transmissible par voie sexuelle, cependant cette voie de transmission est rare, comparée à d'autres virus transmis sexuellement, comme le HBV ou le HIV.

## 3. Traitement de l'infection chronique par le HCV

Il n'existe à l'heure actuelle aucun vaccin contre le HCV. Bien que l'infection par le HCV soit le seul exemple connu d'infection virale chronique qui peut être complètement éliminée de

l'individu infecté grâce au traitement, tous les patients ne guérissent pas de leur hépatite C et cette infection est l'indication la plus commune de transplantation hépatique (Brown, 2005). Par contre, après transplantation, on observe une ré-infection universelle et rapide du greffon, ainsi qu'une progression accélérée de la maladie (Watt et al., 2009). Par ailleurs, la prise en charge thérapeutique de l'infection par le HCV chez le patient transplanté est complexe.

a) Traitement antiviral actuel

Le traitement actuel (SOC, standard of care), constitué d'interféron-alpha (IFN- $\alpha$ ) pégylé combiné à la ribavirine, est limité par la résistance, la toxicité et un coût élevé (Tai and Chung, 2009). En effet, l'efficacité générale du traitement est comprise entre 40 et 80% de réponses virologiques soutenues (SVR, sustained virological response) suivant le génotype viral: moins de 50% des patients ont une SVR pour le génotype 1, qui est le génotype dominant dans 70% des infections (Fried et al., 2002; Taliani et al., 2006) et 80% ont une SVR pour les génotypes 2 et 3 (Munir et al., 2010). Récemment, des substances antivirales directes (DAA, direct acting antiviral) ciblant des protéines du HCV (protéase, polymérase, NS5A, pour revue (Sarrazin et al., 2012)) ont été mises au point et permettent d'améliorer la réponse virologique, la toxicité et les résistances (Hezode et al., 2009). En 2011, deux inhibiteurs de la protéase à sérine NS3/4A du HCV (boceprevir, Merck et télaprévir, Vertex / Janssen) ont reçu l'approbation réglementaire pour le traitement de l'infection par le HCV des patients infectés par le génotype 1. L'ajout d'un DAA à la combinaison d'IFN- $\alpha$  pégylé et de ribavirine a considérablement amélioré la SVR et a réduit la durée de la thérapie pour beaucoup de patients HCV positifs (Pawlotsky, 2011; Sarrazin et al., 2012). Cependant, même dans les pays riches comme les Etats-Unis et certains pays européens, plus de la moitié des personnes infectées par le HCV ne sont pas diagnostiquées (Volk et al., 2009). Sur les 170 millions d'infection estimées dans le monde, pas plus de 10% des patients sont sous traitement (Thomas, 2010). Bien que ces nouveaux traitements soient plus efficaces, l'ajout d'un DAA au SOC peut entraîner des interactions médicamenteuses et des effets indésirables, tels qu'éruptions cutanées, brûlures anales, anémie et ces nouvelles molécules ne sont pas efficaces contre tous les génotypes du HCV. Les nouveaux effets indésirables causés par ces DAA, ainsi que les effets de l'IFN- $\alpha$  et de la ribavirine rendent le traitement de l'infection par le HCV difficile dans de nombreux cas. Par ailleurs, les DAA peuvent aussi mener à la sélection de variants du HCV résistants à ces nouvelles drogues. Même si les nouvelles générations d'inhibiteurs seront plus faciles à tolérer, la prochaine étape importante dans la thérapie du HCV est l'élimination de l'IFN- $\alpha$  en utilisant des combinaisons de DAA (Lok et al., 2012).

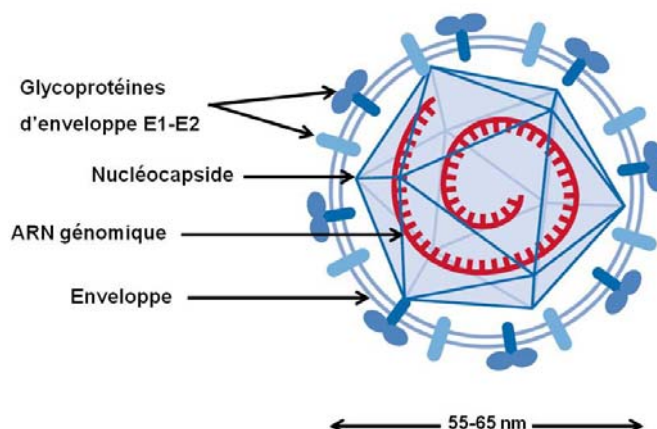
b) Futurs traitements potentiels

De récentes études dans des modèles précliniques et des essais cliniques ont mis en évidence que des agents ciblant l'hôte (HTA, host targeting agent) peuvent fournir une nouvelle stratégie prometteuse pour répondre aux besoins médicaux et aux limitations du SOC. Deux concepts principaux de HTA sont explorés: la première stratégie vise à interférer avec les facteurs de l'hôte nécessaires à la pathogenèse (entrée, réplication et assemblage) et la deuxième stratégie consiste à stimuler l'immunité innée du patient (Zeisel et al., 2012). Les HTA peuvent offrir une perspective prometteuse grâce à leurs caractéristiques qui les distinguent des DAA: les HTA imposent une barrière génétique très élevée à la résistance virale et sont caractérisés par une large activité contre différents génotypes (Zeisel et al., 2012). En effet, les HTA inhibent l'infection par le HCV de tous les génotypes majeurs, des quasi-espèces isolées chez des patients et des variants d'échappement qui sont résistants à la neutralisation des anticorps de l'hôte (Zeisel et al., 2012). Enfin, en agissant par l'intermédiaire d'un mécanisme d'action complémentaire, les HTA peuvent agir de manière synergique avec l'IFN- $\alpha$  ou les DAA (Zeisel et al., 2012).

## II. Le virus de l'hépatite C

### 1. Organisation génomique du HCV

Le HCV est un virus enveloppé possédant un génome à ARN simple brin de polarité positive d'environ 9,6 kb codant pour un précurseur de polyprotéine d'environ 3000 acides aminés (aa) (Penin et al., 2004b). L'ARN viral est contenu dans une capsidie icosaédrique de 55 à 65 nm de diamètre (Kaito et al., 1994). L'ARN comprend un cadre ouvert de lecture (ORF, open reading frame) unique codant pour la polyprotéine virale, flanqué en 5' et 3' de régions non traduites (UTR, untranslated regions) qui comportent des structures ARN très conservées et essentielles pour l'initiation de la traduction de la polyprotéine et la réplication du génome dans le réticulum endoplasmique (RE) (Penin et al., 2004b). L'enveloppe du HCV dérive de la bicouche lipidique de l'hôte et elle contient les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 impliquées dans l'entrée du virus. La nucléocapsidie renferme quant à elle la protéine de capsidie core et l'ARN génomique. (Figure 2)



**Figure 2: Représentation schématique du HCV.** Le HCV est un virus enveloppé de 55 à 65 nm de diamètre. Son génome est un ARN monocaténaire de polarité positive d'environ 9600 nucléotides. Il est contenu dans une capsidie protéique icosaédrique, elle-même située à l'intérieur d'une enveloppe lipidique dans laquelle sont insérées les glycoprotéines d'enveloppes E1-E2. (Adapté de : (Ploss and Rice, 2009)).

#### a) Les régions non-traduites

**La partie 5'UTR**, hautement conservée et structurée, contient à la fois les facteurs déterminants pour la traduction de l'ORF en polyprotéine, mais aussi des éléments pour la réplication de l'ARN (Astier-Gin et al., 2005). Elle est composée de plusieurs structures secondaires en "tige-boucle" dont une grande partie forme un IRES (internal ribosome entry site) destiné à recruter directement la petite sous-unité 40S du ribosome initiant la traduction coiffe-indépendante des ARN viraux (Spahn et al., 2001). La région 5'UTR forme une structure tertiaire comprenant 4 domaines distincts, I à IV. Les domaines II, III et IV sont indispensables à l'activité IRES. En effet, il semblerait que (i) la séquence en amont de l'IRES soit essentielle à la réplication de l'ARN viral, (ii) des séquences dans l'IRES soient nécessaires à la réplication efficace du virus et (iii) la tige-boucle du domaine II de l'IRES soit cruciale pour la réplication (Appel et al., 2006; Friebe et al., 2001). *In vitro*, il a été montré qu'un micro-ARN, miR-122, spécifiquement exprimé dans le foie, a la capacité de faciliter la traduction (Henke et al., 2008) et la réplication virale du HCV en se fixant sur l'IRES (Jopling et al., 2005). *In vivo*, chez le chimpanzé, il a été montré que la séquestration de miR-122 entraîne une diminution de la charge virale (Lanford et al., 2010). Le blocage de miR-122 par l'acide nucléique antisens SPC3649 réduit la réplication du HCV d'une manière indépendante du génotype *in vitro* (Li et al., 2011). De plus, l'administration de miravirsén/SPC3649 à des chimpanzés infectés chroniquement avec le génotype 1 conduit à une suppression de la virémie, en l'absence de

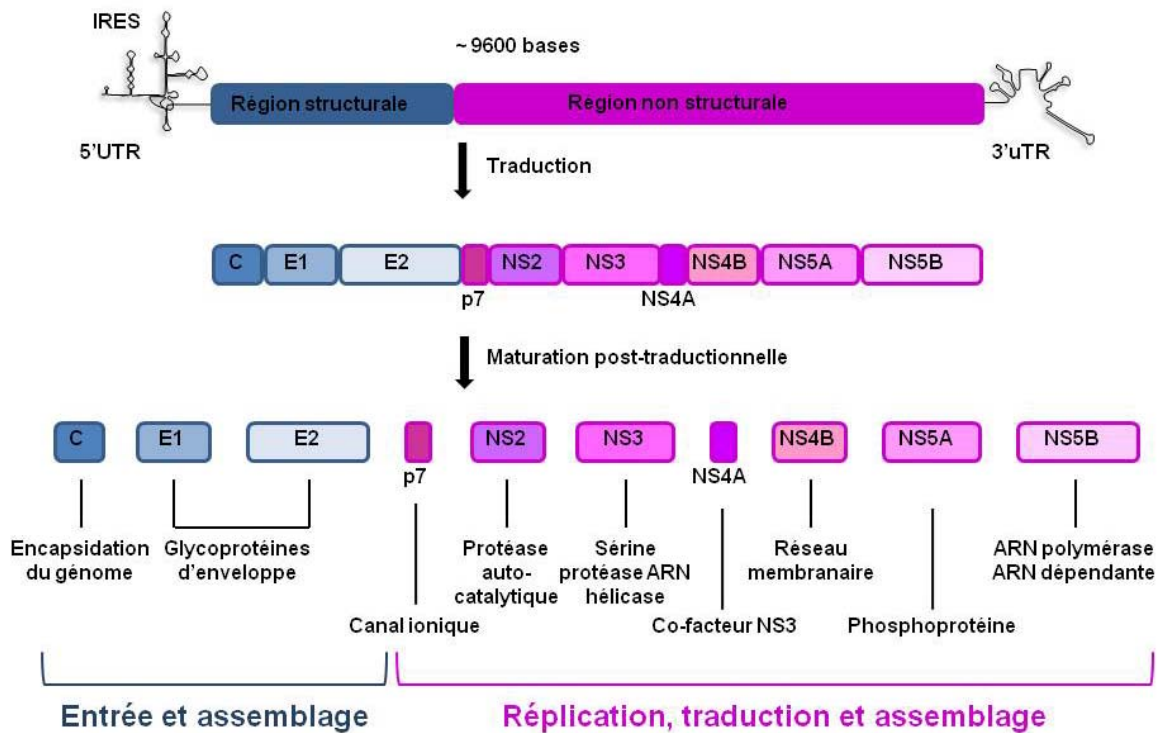


résistance virale (Lanford et al., 2010). Récemment, la sécurité, la tolérance et l'efficacité de miravirsén/SPC3649 ont été évalués dans une étude clinique de phase 2a. Le traitement de patients infectés par le génotype 1 a été bien toléré et a fourni une activité antivirale robuste, dose-dépendante et qui a été maintenue pendant plus de quatre semaines après la fin du traitement (Janssen et al., 2011).

**La partie 3'UTR** joue un rôle important dans la réplication virale (Friebe and Bartenschlager, 2002; Kolykhalov et al., 2000). Elle est constituée de 3 domaines: (i) une région variable, (ii) une séquence interne uracile/pyrimidine (polyU/UC) et (iii) une queue X très structurée et hautement conservée comprenant trois tige-boucles (Kolykhalov et al., 1996; Tanaka et al., 1996). La partie 3'UTR joue un rôle dans l'initiation et la régulation de la réplication virale et semble impliquée dans la synthèse d'ARN de polarité négative au cours de la réplication virale et dans la traduction dépendante de l'IRES (Georgel et al., 2010; Song et al., 2006).

#### b) Les protéines virales

L'IRES initie la traduction de la polyprotéine au niveau du RE (Wang et al., 1993). La polyprotéine est clivée, de manière co- et post-traductionnelle, par des protéases virales et cellulaires et permet de générer 10 protéines virales: (i) les protéines structurales (protéine de capsid core et glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2) qui sont responsables de l'entrée et de l'assemblage et (ii) les protéines non structurales (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B) responsables de la réplication, la traduction et l'assemblage (Moradpour et al., 2007). Elles sont séparées par le polypeptide p7 qui est un canal ionique membranaire (Penin et al., 2004b) (pour revue (Ploss and Dubuisson, 2012) (Figure 3).



**Figure 3: Organisation génomique du HCV.** Le génome du HCV comprend un ARN positif de 9600 bases. La région 5'UTR, contenant l'IRES, est suivie d'un cadre de lecture ouvert codant pour les protéines structurales et les protéines non structurales, et de la région 3'UTR nécessaire pour la réplication. La polyprotéine d'environ 3010 acides aminés est clivée par des protéases cellulaires et virales pour obtenir les protéines structurales (en bleu) et les protéines non structurales (en rose). (Adapté de : (Moradpour et al., 2007))

#### - les protéines structurales

La première protéine traduite est la protéine **core** (ou protéine de capsid), qui est un constituant majeur de la nucléocapside virale. Cette phosphoprotéine de 23 kDa est d'abord libérée dans la lumière du RE, puis maturée en une protéine de 21 kDa (McLauchlan et al., 2002), ce qui lui permet d'être transportée vers les gouttelettes lipidiques, site d'assemblage des particules virales.

La protéine core est composée de trois domaines distincts. Le domaine D1 est un domaine N-terminal hydrophile contenant une forte majorité d'aa basiques et qui participe principalement à la localisation de l'ARN et à sa liaison aux UTR viraux (Suzuki et al., 2005), ce qui suggère une implication dans le contrôle de la réplication virale, de la traduction et de l'encapsidation. Le domaine D2 est un domaine C-terminal hydrophobe. Ce domaine est impliqué dans la liaison de la protéine core avec les membranes du RE, les membranes

mitochondriales et les gouttelettes lipidiques (Schwer et al., 2004; Suzuki et al., 2005). Le domaine D3 est suffisant pour permettre l'accumulation de lipides par un mécanisme indépendant des domaines 1 et 2 et modifie le trafic des lipides (Jhaveri et al., 2009).

La protéine **ARFP** (alternate reading frame protein) ou protéine F (frameshift) est produite suite au décalage du cadre de lecture ribosomique en -2/+1 dans la région N-terminale codant pour core (Varaklioti et al., 2002; Wolf et al., 2008). La protéine ARFP est une petite protéine de 17 kDa qui est localisée dans le RE après la traduction. La durée de vie de cette protéine est d'environ 10 minutes, en raison de sa dégradation par le protéasome (Xu et al., 2003). Des anticorps et des lymphocytes T spécifiques dirigés contre ARFP ont été détectés chez des patients chroniquement infectés, ce qui suggère que la protéine est exprimée au cours de l'infection (Walewski et al., 2001; Wolf et al., 2008). La protéine ARFP n'est pas nécessaire pour la réplication du HCV à la fois *in vivo* et *in vitro* (McMullan et al., 2007). La fonction de cette protéine dans le cycle de vie du HCV est inconnue, mais elle semble impliquée dans la persistance virale (Baril and Brakier-Gingras, 2005). De plus, ARFP pourrait moduler l'expression de cytokines (Fiorucci et al., 2007).

**Les glycoprotéines d'enveloppe E1 (31 kDa) et E2 (70 kDa)** sont des composantes essentielles à la morphogénèse et à l'infectiosité du HCV et jouent un rôle crucial dans l'entrée et la fusion membranaire (Bartosch et al., 2003a). E1 et E2 sont des glycoprotéines transmembranaires de type I qui forment des hétérodimères liés de manière non covalente dans le RE par leur domaine transmembranaire (Cocquerel et al., 2000; Op De Beeck et al., 2001). Elles sont fortement N-glycosylées et contiennent jusqu'à 5 et 11 sites potentiels de glycosylation, respectivement (Cocquerel et al., 2002) et de multiples ponts disulfures. L'interaction d'E2 avec un ou plusieurs composants du complexe de facteurs d'entrée permet l'attachement du virus aux cellules cibles et la fusion des membranes cellulaires et virales lors de l'entrée du virus (Barth et al., 2003; Barth et al., 2006; Flint et al., 2000; Scarselli et al., 2002). Il a été montré qu'E1 et E2 interagissent avec les héparanes sulfates (HS) (Barth et al., 2003; Barth et al., 2006). E2 seulement interagit avec la tétraspanine CD81 (Pileri et al., 1998), le récepteur scavenger de classe B de type I (SR-BI) (Scarselli et al., 2002) et probablement occludine (OCLN) (Liu et al., 2009). Les deux glycoprotéines E1 et E2 semblent être impliquées dans le processus de fusion membranaire nécessaire à l'internalisation du virus dans la cellule hôte (Lavillette et al., 2007), mais leur rôle précis dans l'étape de fusion n'est pas encore bien défini. Compte tenu de leur importance dans les interactions virus-hôte, les glycoprotéines

d'enveloppe sont des cibles majeures des nAb (Barth et al., 2003; El Abd et al., 2011; Kachko et al., 2011; Owsianka et al., 2005). Récemment, des virus mutants dans E1 montrent un défaut de transmission de cellule à cellule et indiquent que la glycoprotéine E1 du HCV peut également affecter la protéine de fusion E2 en modulant sa reconnaissance du récepteur cellulaire CD81 (Wahid et al., 2012). Ces données identifient des fonctions supplémentaires de la glycoprotéine E1, comme une molécule qui permet de contrôler la capacité de liaison de la protéine de fusion E2 (Wahid et al., 2012).

Plusieurs régions hypervariables (HVR) dans la glycoprotéine d'enveloppe E2 ont été identifiées où les séquences en aa diffèrent d'environ 80%, non seulement parmi les géotypes du HCV, mais aussi parmi les sous-types d'un même géotype (Kato, 2001; Weiner et al., 1991). Cette variabilité peut entraîner l'échappement viral du système immunitaire de l'hôte et la persistance du virus (von Hahn et al., 2007).

**La protéine p7** (7 kDa) est la plus petite protéine virale du HCV. Elle est intercalée entre les protéines structurales et non structurales, car elle provient d'un clivage imparfait d'E2 et a été décrite comme une protéine membranaire intégrale (Carrere-Kremer et al., 2002; Steinmann et al., 2007). p7 comprend deux domaines transmembranaires organisés en hélices  $\alpha$ , reliés entre eux par une boucle cytoplasmique. L'orientation de sa partie N- et C-terminale est dirigée vers la lumière du RE. p7 n'est pas nécessaire pour la réplication de l'ARN virale *in vitro*, mais est essentielle à l'infection par le HCV *in vivo* chez le chimpanzé (Sakai et al., 2003). Il a été suggéré que p7 s'oligomériserait sous forme d'hexamères à la membrane du RE et pourrait agir comme un canal ionique du calcium, d'où son appartenance à la famille des viroporines (Nieva et al., 2012). p7 joue un rôle essentiel dans l'assemblage et la libération des particules du HCV (Steinmann et al., 2007). De plus, il a été récemment montré que p7 interagit avec NS2 pour l'assemblage des particules du HCV et cette interaction régule la localisation de core (Boson et al., 2011; Jirasko et al., 2010; Popescu et al., 2011). Son implication dans l'assemblage viral est indépendante de son activité de canal ionique, ce qui suggère que p7 a une autre fonction dans l'assemblage des particules du HCV (Boson et al., 2011; Tedbury et al., 2011). De plus, l'entrée de certains géotypes du HCV est partiellement entravée en présence de certains inhibiteurs de p7 (comme l'amantadine), suggérant que le HCV pourrait nécessiter p7 pour l'entrée dans les cellules (Griffin et al., 2008).

- les protéines non-structurales

Les protéines non-structurales comprennent (i) l'autoprotéase NS2-3, (ii) la protéase à sérine NS3, (iii) l'hélicase à ARN situé dans l'extrémité C-terminale de NS3, le polypeptide NS4A, (iv) la protéine NS4B et (v) la réplicase NS5A et (vi) l'ARN polymérase ARN-dépendante NS5B. Comme pour tout virus à ARN positif, les protéines NS forment un complexe de réplication associé à la membrane avec l'ARN viral réplcatif et divers composants de la cellule hôte (Moradpour et al., 2007).

La protéine NS2 et le domaine N-terminal de NS3 fonctionnent comme une métalloprotéase dépendante du zinc qui permet de cliver la jonction entre NS2 et NS3 (Grakoui et al., 1993; Lorenz et al., 2006).

**NS2** est une protéinase virale non-glycosylée de 21-23 kDa. C'est une protéine transmembranaire, avec 3 segments insérés dans la membrane du RE (Yamaga and Ou, 2002), qui joue un rôle dans le complexe de réplication et qui participe aussi à la production de particules infectieuses (Jones et al., 2007). En effet, le domaine protéase de NS2, mais pas son activité enzymatique, est requis pour la production de particules infectieuses (Jirasko et al., 2008). L'activité enzymatique de NS2 et le clivage de NS2/NS3 est essentielle à la réplication virale (Dentzer et al., 2009). NS2 interagit avec les glycoprotéines d'enveloppe, p7 et NS3 et recrute des protéines virales aux gouttelettes lipidiques. Ainsi, NS2 agit comme un des principaux organisateurs de l'assemblage des particules infectieuses du HCV (Jirasko et al., 2010). Récemment, il a été rapporté que l'interaction de p7 et NS2 induit une localisation de core au RE qui est requise pour l'initiation de l'assemblage viral (Boson et al., 2011).

**NS3** est une protéine multifonctionnelle de 70 kDa qui possède deux activités enzymatiques distinctes: un domaine N-terminal à sérine protéase et un domaine C-terminal à hélicase à ARN qui jouerait un rôle dans la réplication de l'ARN viral et dans les étapes précoces de l'assemblage des particules virales. L'activité enzymatique des deux domaines est essentielle à la réplication virale (Bartenschlager et al., 2004). Le polypeptide NS4A de 8 kDa est un co-facteur pour la protéase à sérine de NS3 (Failla et al., 1994). La protéase NS3-4A joue un rôle essentiel dans le cycle de vie du HCV et catalyse le clivage de la polyprotéine virale au niveau des jonctions de NS3/NS4A, NS4A/NS4B, NS4B/NS5A et NS5A/NS5B (Kim et al., 1996; Penin et al., 2004b). Les inhibiteurs de la protéase NS3/4A, comme le télaprévir et le bocéprévir, ont récemment été approuvés en Europe et aux États-Unis pour le traitement de patients infectés par le HCV de génotype 1, en combinaison avec l'IFN- $\alpha$  pégylé et la ribavirine.

Un grand nombre d'inhibiteurs de deuxième génération sont testés en ce moment dans des études cliniques.

**NS4B** est une protéine membranaire intégrale de 27 kDa orientée vers le cytoplasme qui possède 4 domaines transmembranaires. Elle est associée au RE ou à des membranes dérivées du RE (Hugle et al., 2001). Elle joue un rôle crucial dans l'induction du complexe de réplication virale lié aux membranes, appelé «membranous web» et la maturation de la polyprotéine (Gosert et al., 2003; Gretton et al., 2005). La protéine NS4B a la capacité de s'oligomériser, ce qui facilite la formation du complexe de réplication (Yu et al., 2006). Récemment, il a été montré que NS4B supprime fortement la production d'IFN- $\beta$  dépendante de STING (stimulator of interferon genes) dans le RE (Nitta et al., 2012).

**NS5A** est une phosphoprotéine de liaison à l'ARN, ou réplicase, impliquée dans la réplication virale de l'ARN. NS5A est localisée dans les régions cytoplasmiques périnucléaires de la cellule, est ancrée de manière stable aux membranes et existe dans un état de base et hyperphosphorylée sur de multiples résidus sérines et thréonine (p56 et p58) (Penin et al., 2004a; Tellinghuisen et al., 2008a). Elle est composée de 3 domaines: (i) le domaine I est un domaine N-terminal de liaison au zinc  $Zn^{2+}$  permettant une fixation à l'ARN et nécessaire à la réplication de l'ARN viral (Tellinghuisen et al., 2004; Tellinghuisen et al., 2005); (ii) le domaine II n'est pas indispensable à la réplication virale; (iii) et le domaine III est essentiel pour l'assemblage des virions (Appel et al., 2008; Tellinghuisen et al., 2008a; Tellinghuisen et al., 2008b). L'interaction de NS5A avec l'apolipoprotéine E (apoE) est nécessaire pour l'assemblage et l'export des virions infectieux (Benga et al., 2010; Jiang and Luo, 2009). NS5A a également un rôle dans la régulation de l'équilibre entre l'activité de réplication de l'ARN viral et l'assemblage des virions (Alvisi et al., 2011). Il a été suggéré que son taux de phosphorylation pourrait être le facteur qui régule la réplication virale (Evans et al., 2004; Neddermann et al., 2004). Par ailleurs, NS5A est un puissant inhibiteur de la réponse IFN induite par l'activation de la protéine kinase R par les ARN double brin, un médiateur clé dans la réponse antivirale et antiproliférative induite par l'IFN (Gale et al., 1997; Tan et al., 1999). Récemment, des inhibiteurs de NS5A en développement clinique ont montré réguler la réplication virale. Le daclatasvir (BMS-790052, Bristol-Myers Squibb), le premier inhibiteur de NS5A en clinique, montre une puissante activité antivirale *in vitro* contre tous les génotypes du HCV, mais également contre le génotype 1 dans des études en monothérapie. Le daclatasvir est actuellement en cours d'essais cliniques de phase 2, en combinaison avec l'IFN- $\alpha$  pégylé et

la ribavirine, ou avec inhibiteurs de protéase ou des analogues nucléotidiques (Gao et al., 2010).

La protéine **NS5B** est une ARN polymérase ARN-dépendante de 66 kDa qui assure la synthèse des brins d'ARN viraux positifs et négatifs (Grakoui et al., 1993). C'est une enzyme clé lors de la réplication de l'ARN du HCV. Comme d'autres polymérases, NS5B a une structure classique en main droite (Bressanelli et al., 1999). Le domaine catalytique de NS5B est associé à la membrane du RE par l'intermédiaire d'un domaine transmembranaire C-terminal qui est essentiel à la réplication de l'ARN du HCV (Appel et al., 2006). L'interaction des protéines virales NS3 et NS5A module l'activité de NS5B (Bartenschlager et al., 2004). Récemment, il a été suggéré que NS5B pourrait également être impliquée dans l'assemblage des particules virales (Gouklani et al., 2012). L'importance de cette protéine dans la réplication de l'ARN viral en fait une cible majeure de nouvelles molécules thérapeutiques, comme les analogues nucléosidiques / nucléotidiques, en ciblant le site actif de la protéine, pour le traitement de l'infection par le HCV (Patil et al., 2011).

## 2. L'hétérogénéité du virus

### a) Structure des virions du HCV dans le sang

Des études par gradient de densité ont permis de mettre en évidence que le HCV circule sous diverses formes (en densité et en composition) dans le sérum d'un patient infecté (Andre et al., 2002). La densité des particules virales varie de 1,03 à 1,25 g/mL et cette variation est due à l'association des virions à d'autres molécules. Les différentes formes du HCV sont: (i) des virions associés à des lipoprotéines de très faible densité (very low density lipoprotein, VLDL) et de faible densité (low density lipoprotein, LDL) qui semblent représenter la fraction infectieuse; (ii) des virions liés aux immunoglobulines et (iii) des virions libres (Andre et al., 2002; Penin et al., 2004b). Les particules de faible densité sont appelées lipo-viro-particules en raison de leur association à des lipoprotéines. Ces particules sont riches en triglycérides et contiennent, en plus de la capsid virale renfermant l'ARN génomique du HCV, les glycoprotéines E1 et E2 et les apolipoprotéines B et E (Diaz et al., 2006).

Les virions du HCV n'ont pas encore pu être visualisés de manière concluante par microscopie électronique et l'information sur leur structure 3D est donc manquante. L'obstacle

principal est la quantité limitée de virus qui peut être obtenue à partir du sérum (Penin et al., 2004b).

b) Les différents sous-types du HCV

Le HCV présente une grande variabilité génétique. En effet, l'origine de cette variabilité est l'absence d'activité exonucléasique correctrice de l'ARN polymérase ARN-dépendante (NS5B), mais également le niveau élevé de réplication *in vivo* ( $10^{10}$  à  $10^{12}$  nouveaux virions par jour) (Neumann et al., 1998).

Le HCV est actuellement classé en six génotypes majeurs (1 à 6) et en plusieurs sous-types (a, b...) (Bukh et al., 1995; Simmonds et al., 2005) qui diffèrent les uns des autres au niveau nucléotidique de 31-33% et 20-25% respectivement et de par leur localisation géographique (Kuiken and Simmonds, 2009). Les génotypes 1, 2 et 3 sont distribués de manière homogène sur la planète, bien qu'avec des prévalences différentes. Le génotype 1a est le plus commun en Amérique du Nord et le génotype 1b en Europe et en Asie. Certains génotypes sont confinés à certaines régions du monde, comme le génotype 4 en Egypte, le 5 en Afrique du Sud et le 6 en Indochine (Farci and Purcell, 2000; Zein, 2000) (Figure 1).

La variabilité du HCV ne se limite pas seulement aux génotypes et aux sous-types; le fort taux de mutation mène à la génération de quasi-espèces qui représentent une hétérogénéité génomique dans le sérum d'un patient (Martell et al., 1992). La génération de quasi-espèces du HCV contribue à l'échappement viral de l'immunité humorale et cellulaire (Cox et al., 2005; Kato et al., 1993; von Hahn et al., 2007) mais est aussi en lien avec la progression des maladies hépatiques (Honda et al., 1994).

### **III. Les modèles d'étude du HCV**

Le cycle de vie du HCV et son interaction avec les cellules hôtes ont longtemps été difficile à étudier en raison de l'absence de systèmes appropriés de cellules infectables par le HCV et de petits modèles animaux. Par conséquent, ce manque de modèle a été un obstacle au développement de vaccins préventifs et thérapeutiques anti-HCV. Cependant, le développement de différents modèles *in vitro* et *in vivo* a fait progresser considérablement notre compréhension du cycle viral du HCV ces dernières années.



## 1. Les modèles *ex vivo* et *in vitro*

Depuis l'isolation du HCV en 1989, des systèmes de culture cellulaire pour amplifier le virus dans des conditions de laboratoire ont été recherchées. Le développement de modèles *de culture* constitue un outil important pour mettre au point de nouveaux antiviraux contre différentes cibles du HCV et étudier les étapes du cycle de vie du virus telles que l'entrée, l'endocytose, la réplication, la libération et la pathogenèse. Les systèmes de culture *ex vivo* du HCV sont représentés par le plasma dérivé de patients infectés. Les systèmes de culture *in vitro* du HCV englobent les formes tronquées des glycoprotéines d'enveloppe soluble (sE1, sE2), les «virus-like» particules (VLP), les pseudoparticules du HCV (HCVpp), les réplicons subgénomiques et génomiques et les particules recombinantes du HCV adaptées en culture cellulaire (HCVcc).

### a) Le plasma dérivé de patients infectés par le HCV

L'inoculation d'hépatocytes avec du sérum dérivé de patients infectés par le HCV a été l'une des premières approches pour étudier l'infection par le HCV *in vitro* (Rumin et al., 1999). Les hépatocytes primaires humains (PHH), de chimpanzés ou de tupaïas peuvent être infectés avec succès avec du sérum (Barth et al., 2005; Castet et al., 2002). L'inconvénient de ce système est le faible niveau de réplication du HCV qui nécessite une analyse par RT-PCR pour détecter l'ARN viral dans les cellules infectées. Il y a absence ou très faible production de particules virales infectieuses (von Hahn and Rice, 2008). De plus, en raison de l'hétérogénéité du virus dans le sérum et de son association avec des lipoprotéines, il est difficile d'obtenir un inoculum homogène et bien caractérisé.

### b) Les formes tronquées des glycoprotéines d'enveloppe solubles

Une forme tronquée et soluble de la glycoprotéine E2 recombinante (sE2) a été utilisée pour étudier l'interaction cellule-virus conduisant à l'identification de récepteurs du HCV impliqués dans l'entrée du virus. Il s'agit notamment de la tétraspanine CD81 (Pileri et al., 1998) et de SR-BI (Scarselli et al., 2002). Les protéines sE1 et sE2 ont également aidé à étudier l'interaction des glycoprotéines d'enveloppe avec les HS (Barth et al., 2003; Barth et al., 2006; Haberstroh et al., 2008). sE2 a aussi été utilisée pour détecter des nAb dirigés contre le virus (Rosa et al., 1996). Récemment, il a été démontré que l'immunisation de souris et de chimpanzés avec sE2 induit des nAb (Kachko et al., 2011). Etant donné leur conformation complexe au sein du virus natif, où E1 et E2 forment un hétérodimère sur l'enveloppe virale, les

protéines sE1 et sE2 recombinantes isolées ne constituent pas un bon modèle (Burlone and Budkowska, 2009) pour étudier le processus d'attachement et d'entrée car elles ne s'hybrident pas (Bartenschlager, 2013).

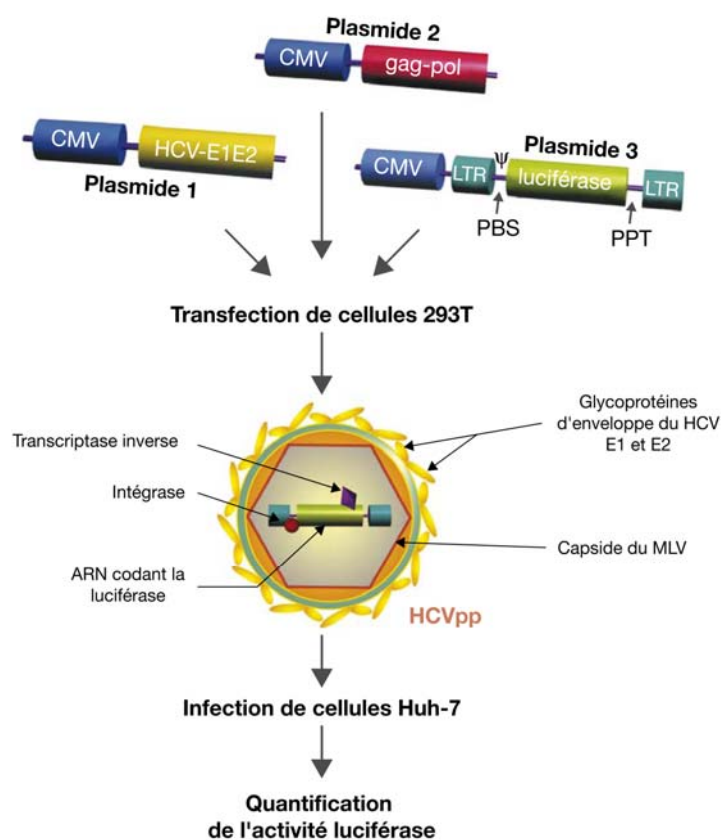
c) Les «virus-like» particules

Les VLP sont des particules générées par auto-assemblage des protéines structurales du HCV, à savoir core, E1, E2 et p7 dans un système d'expression de cellules d'insectes (baculovirus) (Baumert et al., 1998). Les VLP ne peuvent répliquer à cause de leur déficience en génome viral. Les VLP sont caractérisées par des propriétés morphologiques, biophysiques et antigéniques similaires à celles de virions isolés à partir de patients infectés par le HCV (Baumert et al., 1998), et ont donc été proposées comme vaccin potentiel (Baumert et al., 1998; Steinmann et al., 2004). Le complexe hétérodimérique E1 et E2 des VLP est similaire à celui de virions natifs et la capacité des VLP à se fixer et à entrer dans des lignées hépatocytaires, des PHH ou des cellules dendritiques en font un modèle intéressant afin d'étudier les interactions virus-hôte (Triyatni et al., 2002; Wellnitz et al., 2002). De plus, les VLP induisent des réponses immunitaires cellulaires spécifiques au HCV et peuvent donc protéger les chimpanzés d'une infection persistante (Elmowalid et al., 2007). Une limitation de ce modèle réside dans le fait que ces particules ne contiennent pas de gène rapporteur, et par conséquent, le mécanisme de l'attachement et de l'entrée dans les cellules nécessitent l'utilisation de techniques de microscopie ou de cytométrie en flux.

d) Les pseudoparticules du HCV

Les pseudoparticules du HCV (HCVpp) représentent le premier modèle *in vitro* robuste pour étudier les étapes précoces de liaison et d'entrée du virus dans la cellule cible, et peuvent être utilisées dans des tests de routine et des criblages à haut débit. Les HCVpp sont composées des glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2, qui sont assemblées à la surface de particules de capsides rétrovirales ou lentivirales (Bartosch et al., 2003a; Hsu et al., 2003). Les HCVpp sont produites par transfection de cellules de rein embryonnaire (HEK 293T) avec trois vecteurs d'expression: (i) le premier vecteur code pour la protéine de capside (gag-pol) de rétrovirus soit le virus de la leucémie murine (MLV) ou de lentivirus (HIV), (ii) le second vecteur exprime les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 et (iii) le troisième vecteur porte un génome rétroviral ou lentiviral contenant des longues répétitions terminales et des signaux d'emballage et il code pour un gène rapporteur tel que la  $\beta$ -galactosidase, la GFP (green fluorescent protein) ou la luciférase (Bartosch et al., 2003a; Hsu et al., 2003) (Figure 4). La présence du

gène rapporteur permet la détermination rapide et fiable de l'infectiosité (Bartosch et al., 2003a; Hsu et al., 2003). Les HCVpp sont considérées comme un outil de référence pour étudier les propriétés des glycoprotéines d'enveloppe du HCV et les mécanismes moléculaires de l'entrée du HCV. Les HCVpp présentent un tropisme préférentiel pour les cellules hépatiques et ils infectent les lignées hépatocytaires, comme les cellules Huh-7 et leurs dérivés, ainsi que les PHH (Bartosch et al., 2003a; Hsu et al., 2003). Ce modèle a été utilisé pour identifier des récepteurs d'entrée du HCV, à savoir claudine-1 (CLDN1) (Evans et al., 2007) et occludine (OCLN) (Ploss et al., 2009). L'entrée des HCVpp peut être spécifiquement neutralisée par des anticorps anti-E1 et anti-E2 ainsi que par du sérum humain ou de chimpanzé infecté par le HCV (Bartosch et al., 2003a; Hsu et al., 2003; Lavillette et al., 2005; Law et al., 2008; Meunier et al., 2005; Pestka et al., 2007; Vanwolleghem et al., 2008; von Hahn et al., 2007). Les HCVpp récoltées à partir du surnageant des cellules transfectées imitent les premières étapes du cycle de vie du HCV. Elles ont des propriétés antigéniques semblables à celle du HCV natif, mais à la différence du virus naturel, les HCVpp ne sont pas associées à des lipoprotéines, car elles sont produites dans les cellules de rein qui ne synthétisent pas de lipoprotéines (Bartosch et al., 2003b).



**Figure 4: Représentation schématique de la production des HCVpp.** Pour la production des HCVpp, des cellules 293T sont transfectées avec trois vecteurs d'expression. Le premier code les glycoprotéines E1-E2 du HCV. Le second vecteur exprime les protéines codées par les gènes *gag* et *pol* du MLV (matrice, capsid, nucléocapsid, protéase, transcriptase inverse, intégrase). Les protéines de matrice, capsid et nucléocapsid permettent l'encapsidation de l'ARN grâce au signal d'encapsidation ( $\psi$ ), l'assemblage de la particule et son bourgeonnement à la membrane plasmique. Finalement, le troisième vecteur code l'ARN qui va être encapsidé dans les particules. Cet ARN contient des séquences lentivirales nécessaires à la transcription inverse et à l'intégration de l'ADN proviral dans l'ADN génomique de la cellule infectée (LTR, *long terminal repeat* ; PBS, *primer binding site* ; PPT, *polypurine track*) et contient un gène rapporteur codant la luciférase. Les HCVpp sont sécrétées dans le surnageant de culture des cellules 293T et sont utilisées pour infecter des cellules d'hépatocarcinome humain dérivées des Huh-7. Les cellules infectées vont intégrer le gène codant la luciférase dans leur ADN génomique grâce à la transcriptase inverse et à l'intégrase, et par conséquent, vont exprimer la luciférase. L'infectiosité des HCVpp pourra alors être évaluée par quantification de l'activité luciférase dans ces cellules. (Source: F. Helle, Virologie, 2008).

#### e) Les réplicons subgénomiques et génomiques

En 1999, le premier système de réplicon du HCV a été créé (génotype 1b) dans la lignée hépatocytaire Huh7. Les réplicons subgénomiques puis génomiques du HCV ont permis d'étudier la réplication virale (Lohmann et al., 1999; Pietschmann et al., 2002). Le réplicon subgénomique du HCV est un ARN bicistronique répliquant de façon autonome et qui contient (i) le 5'UTR du HCV portant l'IRES du HCV qui permet la traduction d'un gène de résistance à un antibiotique (néomycine), (ii) l'IRES du virus de l'encéphalomyocardite qui assure la traduction des protéines non structurales et (iii) le 3'UTR du HCV. Par transfection de l'ARN du réplicon dans une lignée cellulaire permissive, des lignées cellulaires clonales répliquent de manière stable les réplicons du HCV et peuvent être sélectionnées par antibiotique (Lohmann et al., 1999). En général, la luciférase est utilisée comme rapporteur facilement quantifiable pour contrôler la multiplication de l'ARN du réplicon. La lignée cellulaire Huh7.5 a été obtenue par traitement de cellules Huh7 répliquant de manière stable un réplicon du HCV avec l'IFN- $\alpha$  (Blight et al., 2002). Le réplicon subgénomique du HCV a été le principal outil pour étudier la synthèse de l'ARN du HCV et permettre la découverte et la caractérisation d'inhibiteurs de la réplication virale (Robinson et al., 2011a; Robinson et al., 2011b). Il a été démontré que les réplicons en culture cellulaire contiennent des mutations adaptatives, principalement dans NS3, NS4B et NS5A (Bartenschlager et al., 2004; Evans et al., 2004) qui augmentent de façon marquée le taux de réplication des cellules transfectées (Lohmann et al., 2001). Les réplicons génomiques sont des réplicons subgénomiques complétés avec les protéines structurales

du HCV. Les réplicons subgénomiques et génomiques répliquent efficacement mais ne permettent pas la production de particules virales (Pietschmann et al., 2002).

f) Les particules recombinantes adaptées en culture cellulaire

La capacité de reproduire l'ensemble du cycle de vie du HCV *in vitro* a été réalisée en 2005. L'électroporation de l'ARN entier d'un isolat viral d'un patient japonais souffrant d'une hépatite C fulminante (JFH-1, génotype 2a) dans des cellules Huh7 et dérivées (Huh7.5 et Huh7.5.1) hautement permissives au HCV a conduit à la réplication et à la production *in vitro* de particules recombinantes du HCV (HCVcc) (Lindenbach et al., 2005; Wakita et al., 2005; Zhong et al., 2005). Le surnageant de culture contenant les virions permet d'infecter avec succès des cellules hépatocytaires naïves Huh7 et ses dérivés (Lindenbach et al., 2005; Wakita et al., 2005).

L'infection et la réplication des HCVcc peuvent être contrôlées en utilisant différentes méthodes. Il s'agit notamment des tests pour déterminer la FFU (focus-forming unit), la TCID<sub>50</sub> (50% tissue culture infective dose) (Lindenbach et al., 2005), l'immunocoloration des protéines virales (Lindenbach et al., 2005; Wakita et al., 2005) ou encore l'expression d'un gène rapporteur tel que la luciférase (Koutsoudakis et al., 2006), la GFP (Suratanee et al., 2010) ou la RFP (red fluorescent protein) (Jones et al., 2010). Récemment, une nouvelle stratégie de construction a été développée pour produire un virus HCV double rapporteur contenant un gène de luciférase et un gène de la GFP (Wu et al., 2011). Les HCVcc ont des propriétés similaires aux virus dérivés du sérum, mais les densités des différentes fractions du virus sont plus grandes après production en culture cellulaire (Lindenbach et al., 2006), suggérant des différences dans les propriétés virales. Les HCVcc sont aussi capables d'infecter les chimpanzés et les souris uPA-SCID transplantées avec des PHH (Lindenbach et al., 2006; Wakita et al., 2005) (voir section suivante).

La production de HCVcc de différents génotypes est également possible grâce à l'utilisation de virus chimères intragénotypiques (Lindenbach et al., 2005; Pietschmann et al., 2006) ou intergénotypiques (Pietschmann et al., 2006). Les HCVcc recombinants avec les protéines core-NS2 (Scheel et al., 2011a), NS3-4A (Gottwein et al., 2011) et NS5A (Scheel et al., 2011b) de tous les génotypes majeurs ont été développés pour étudier la résistance aux traitements antiviraux. Le système des HCVcc permet des avancées majeures dans la recherche sur le HCV car il contribue à l'étude du cycle de vie du HCV au complet. De plus, ce modèle a confirmé les résultats obtenus avec des modèles antérieurs tels que le rôle des

glycoprotéines d'enveloppe dans l'entrée du virus (Wakita et al., 2005), le rôle des facteurs cellulaires de l'hôte impliqués dans l'attachement et l'entrée du virus (Koutsoudakis et al., 2006; Lindenbach et al., 2005; Wakita et al., 2005; Zeisel et al., 2007a; Zhong et al., 2005) et l'activité des nAb (Haberstroh et al., 2008; Law et al., 2008). Cependant, la manipulation des HCVcc nécessite un laboratoire de niveau L3 très réglementé.

## 2. Les modèles animaux *in vivo*

### a) Le chimpanzé (*Pan troglodytes*)

Mis à part l'Homme, le chimpanzé est le seul animal pouvant être naturellement infecté par le HCV. La démonstration d'un agent infectieux responsable de l'hépatite non-A non-B et les propriétés physiques du virus ont été obtenus chez le chimpanzé avant l'isolement du HCV. Dans un premier temps, le chimpanzé a été infecté avec des sérums de patients (Alter et al., 1978; Hollinger et al., 1978). Par la suite, le chimpanzé a été utilisé pour étudier l'infectiosité (Sakai et al., 2003), la progression de la maladie, les réponses immunitaires (Bukh et al., 2010; Forns et al., 2000), la vaccination et les nouvelles molécules antivirales (Carroll et al., 2009; Puig et al., 2004). L'infection suit une progression similaire à celle observée chez l'Homme, cependant la réponse immune et la sévérité de la maladie sont amoindries. Il y a plusieurs inconvénients à ce modèle: l'infection chronique est moins grave par rapport à l'Homme et les chimpanzés sont coûteux et difficiles à manipuler car ils ont besoin d'un logement spécial (Barth et al., 2008). De plus, depuis 1988, le chimpanzé a été répertorié comme une espèce en voie de disparition et l'utilisation du chimpanzé reste limitée pour des raisons éthiques (Koike et al., 2010). De ce fait, l'analyse de ce virus a longtemps été entravée par l'absence de petit modèle animal qui peut supporter une infection par le HCV.

### b) Le tupaïa (*Tupaia belangeri*)

Le tupaïa est une musaraigne d'arbre vivant dans le Sud-Est de l'Asie. Cet animal est sensible à plusieurs virus humains et a donc été proposé comme un modèle alternatif d'infection par le HCV. Les hépatocytes de cet animal sont sensibles à l'infection par le HCV : le virus peut entrer, répliquer et produire des particules virales infectieuses (Zhao et al., 2002). De plus, le tupaïa a une légère inflammation au cours de la phase aiguë de l'infection, qui est suivie par le développement d'une stéatose hépatique et la formation de nodules cirrhotiques, se terminant par la tumorigenèse (Amako et al., 2010). Il est à noter que le sérum de tupaïas

infectés permet l'infection d'animaux naïfs, démontrant que les virus produits sont transmissibles (Amako et al., 2010). De plus, il a été démontré que l'expression des facteurs entrée du HCV (CD81, SR-BI, CLDN1 et OCLN) du tupaïa sont en mesure de permettre l'entrée des HCVpp ou l'infection des HCVcc dans des cellules résistantes au HCV (Tong et al., 2011). Ces données montrent que le tupaïa est un modèle animal attractif pour l'étude de l'infection par le HCV, mais le taux d'infection faible et variable et la virémie restent problématiques. Néanmoins, étant donné que ces animaux peuvent soutenir une infection persistante, ils restent une alternative intéressante aux chimpanzés. Cependant, d'autres études sont nécessaires pour mieux caractériser ce modèle animal.

### c) Les souris chimériques hépatiques

#### - Les souris immunodéprimées

D'autres modèles animaux plus pratiques ont été développés pour étudier l'infection par le HCV, et notamment tout d'abord des souris immunodéprimées avec un foie humanisé: **les souris uPA-SCID** (Bukh et al., 2010; Lindenbach et al., 2006; Mercer et al., 2001; Meuleman et al., 2005). Le foie d'une souris immunodéprimée de souche SCID (Severe Combined Immunodeficiency) est détruit par la surexpression d'un transgène activateur de l'urokinase plasminogène dont l'expression est sous la dépendance du promoteur de l'albumine (alb-uPA). L'animal est ensuite greffé avec des PHH qui colonisent le foie. La repopulation des cellules du foie avec des PHH peut atteindre 90%. Ces souris uPA-SCID transplantées avec des PHH peuvent être infectées par le HBV et le HCV *in vivo* (Mercer et al., 2001). La mesure de l'albumine est utilisée pour évaluer l'intégrité et la fonctionnalité des hépatocytes humains transplantés. Une fois stabilisées, les souris uPA-SCID peuvent être infectées, soit par du sérum de patients ou de chimpanzés infectés par tous les génotypes du HCV, soit par des HCVcc (Law et al., 2008; Lindenbach et al., 2006; Mercer et al., 2001; Meuleman et al., 2005; Vanwolleghem et al., 2008).

La charge virale mesurée dans le sérum de ces souris infectées par le HCV est comparable à celle observée chez l'homme. L'infection par le HCV dans ce modèle murin peut être maintenue pendant au moins 4 mois. Durant cette période, la fonction et l'architecture du foie ne sont pas modifiées (Barth et al., 2008). Ce modèle de souris a permis de confirmer le rôle des anticorps anti-récepteurs et des nAb dans le contrôle de l'infection virale (Law et al., 2008; Meuleman et al., 2012; Meuleman et al., 2005; Vanwolleghem et al., 2008). Ce modèle de souris a l'avantage d'être moins cher que le chimpanzé, de reproduction plus rapide et est



utile pour évaluer les traitements antiviraux (Meuleman and Leroux-Roels, 2008). Cependant, ce modèle animal est très difficile à mettre en œuvre. Il exige une expertise considérable dans l'isolement et la transplantation des PHH et dans le maintien des colonies de souris en raison de leur immunosuppression. Le taux de mortalité des souriceaux est estimé à environ 35% (Mercer et al., 2001).

Récemment, un autre modèle a été développé où la destruction des hépatocytes murins chez des souris immunodéficientes est régulé par l'administration orale de 2-(2-nitro-4-trifluorométhylbenzoyl)-1,3-cyclohexanedione (NTBC). Les souris transgéniques utilisées dans cette étude ont été immunodéprimées par la suppression de Fah (fumaryl acetoacetate hydrolase), Rag2 (recombination activating gene 2) et IL-2R $\gamma$  ( $\gamma$ -chain of the receptor for IL-2) (Bissig et al., 2010). L'absence de médicament dans le sang des souris conduit à la mort des hépatocytes murins causés par l'accumulation toxique de catabolites de tyrosine en raison de l'absence de Fah murin, tandis que la présence de l'homologue humain de Fah dans les hépatocytes humains permet à ces cellules de se développer dans le foie de souris suite à la greffe de PHH (Bissig et al., 2010). Ce modèle de **souris Fah<sup>-/-</sup> Rag2<sup>-/-</sup> IL2R $\gamma$ <sup>-/-</sup>** a des atouts comparé au modèle de souris uPA-SCID car le contrôle de la mort des hépatocytes de souris Fah<sup>-/-</sup> Rag2<sup>-/-</sup> IL2R $\gamma$ <sup>-/-</sup> rend ce modèle plus maniable que les souris uPA-SCID. De plus, la repopulation des hépatocytes humains du modèle de souris Fah<sup>-/-</sup> Rag2<sup>-/-</sup> IL2R $\gamma$ <sup>-/-</sup> se produit à une vitesse plus élevée et peut être fait à n'importe quel âge de la souris (Bissig et al., 2010). Néanmoins, ces deux souris ont un inconvénient majeur pour l'étude de l'infection par le HCV *in vivo*: elles ont un déficit immunitaire et l'étude des interactions virus-hôte est donc limitée par le fond génétique de la souris.

- Les souris immunocompétentes

Les souris de fond génétique Balb/C-Rag2- $\gamma$ C ont été utilisées pour exprimer, sous le contrôle d'un promoteur de l'albumine, une caspase 8 fusionnée avec le transgène du domaine de liaison de FK506 qui a une activité de suicide. Des cellules souches hématopoïétiques CD34<sup>+</sup> ont été injectées à ces souris et délivrent une pro-drogue qui conduit à la dimérisation de la caspase 8 et à la mort des hépatocytes murins, permettant ainsi la repopulation avec des cellules progénitrices d'hépatocytes de foie foetal (Washburn et al., 2011). Ce modèle murin est le premier qui permet d'étudier la réponse immunitaire lors de l'infection par le HCV chez la souris. Cependant, certains inconvénients limitent l'utilisation de ce modèle: l'ARN du HCV n'a été détecté qu'à un niveau faible dans le foie et ne peut pas être détecté dans le sérum des



animaux infectés et aucun anticorps anti-HCV ne peut être détecté chez ces souris en raison d'une reconstitution incomplète de la population de cellules B fonctionnelles (Robinet and Baumert, 2011). Ce modèle est donc un pas en avant pour le développement d'un modèle de souris immunocompétent, mais n'est pas encore pleinement opérationnel pour l'étude de tous les aspects de l'infection par le HCV.

Un autre modèle de souris immunocompétentes a été proposé récemment pour l'étude de l'entrée du HCV *in vivo*. En effet, des adénovirus ont été injectés, codant pour les facteurs d'entrée humain CD81 et OCLN et pour les homologues murins de CLDN1 et SR-BI chez la souris (Dorner et al., 2011; Dorner et al., 2012; Zeisel et al., 2011a). Cette expression des facteurs d'entrée du HCV dans les hépatocytes murins permet au virus d'entrer dans ces cellules *in vivo* à condition d'utiliser un système de gène rapporteur sophistiqué, cependant l'absence de réplication robuste du HCV dans les hépatocytes murins limite l'utilisation de ce modèle à l'étude des premières étapes des interactions virus-hôte.

#### **IV. Les facteurs de l'hôte requis pour l'entrée du HCV**

L'entrée du HCV dans les cellules hôtes est un processus complexe qui se déroule en plusieurs étapes impliquant la liaison du virus avec plusieurs facteurs d'entrée (Zeisel et al., 2011b). Beaucoup d'efforts ont été fournis pour développer des systèmes permettant d'étudier les interactions hôte-HCV afin d'identifier les molécules de surface de la cellule hôte importante pour le HCV telles que les tétraspanines CD81 (Pileri et al., 1998), le récepteur des lipoprotéines de faible densité (LDLR) (Agnello et al., 1999), les HS (Barth et al., 2006; Koutsoudakis et al., 2006), SR-BI (Bartosch et al., 2005; Scarselli et al., 2002; Zeisel et al., 2007b), les lectines de type C (DC-SIGN/L-SIGN) (Lozach et al., 2004; Pohlmann et al., 2003), les protéines de jonctions serrées CLDN1 (Evans et al., 2007) et OCLN (Ploss et al., 2009), les récepteurs à tyrosine kinase (RTK) tels que le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) et le récepteur de l'éphrine A2 (EphA2) (Lupberger et al., 2011) ainsi que récemment le récepteur Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) (Sainz et al., 2012a).

##### **1. Les facteurs d'attachement**

Le virus circulant dans le sang doit dans un premier temps quitter la circulation sanguine pour trouver ces cellules cibles dans le foie. Pour cela, les macrophages et les cellules

endothéliales peuvent capturer les particules virales infectieuses et les transférer à des hépatocytes adjacents qui ne sont pas directement en contact avec le sang circulant. Dans un second temps, le virus s'attache à la cellule cible grâce à la liaison des glycoprotéines d'enveloppe E1-E2 à des facteurs présents sur la surface des hépatocytes, tels que les glycosaminoglycanes (incluant les HS), SR-BI et le LDLR (Agnello et al., 1999; Barth et al., 2006; Koutsoudakis et al., 2006). Récemment, il a été démontré que le HCV utilise de manière spécifique la protéine cellulaire apoE pour son attachement aux cellules via les HS (Jiang et al., 2012). De plus, le HCV peut également s'attacher aux cellules cibles via l'interaction des lipoprotéines associées avec des facteurs de l'hôte, tels que LDLR et SR-BI.

a) Les lectines de type C

Le HCV pénètre dans le foie par le sang. Les macrophages du foie (cellules de Kupffer) et les cellules endothéliales peuvent capturer les particules virales infectieuses et les transférer à des hépatocytes adjacents qui ne sont pas directement en contact avec le sang circulant. Ce processus pourrait faire intervenir des lectines de type C tels que les DC-SIGN et les L-SIGN (ou CD209L). DC-SIGN et L-SIGN pourraient être impliquées dans la pathogenèse virale et le tropisme tissulaire (Lozach et al., 2004; Pohlmann et al., 2003). DC-SIGN est exprimée à la surface des cellules de Kupffer, des cellules dendritiques et des lymphocytes tandis que L-SIGN est exprimée sur les cellules endothéliales sinusoidales hépatiques (van Kooyk and Geijtenbeek, 2003). Les deux types de lectines participent à la liaison, l'internalisation et l'élimination de nombreux agents pathogènes (Cambi et al., 2005). La liaison de E2 à L-SIGN pourrait induire la transmission du HCV aux hépatocytes (Cormier et al., 2004). Cependant, ces molécules ne facilitent pas l'entrée du virus (Lai et al., 2006). Comme ces molécules ne sont pas exprimées sur les hépatocytes, il est peu probable qu'elles fonctionnent comme des récepteurs d'entrée (von Hahn and Rice, 2008). Mais DC-SIGN et L-SIGN peuvent fonctionner en tant que récepteurs de capture qui ont la capacité de transmettre le virus aux cellules permissives et ainsi être impliquée dans l'initiation de l'infection par le HCV et dans le tropisme tissulaire (Cormier et al., 2004; Lozach et al., 2004).

b) Les glycosaminoglycanes

Les glycosaminoglycanes (GAG) sont le premier site de fixation du HCV à la surface des hépatocytes (Barth et al., 2003; Germi et al., 2002a). Il y a différents types de GAG: le sulfate de chondroïtine, le sulfate de dermatane, le sulfate de kératane, l'HS, l'héparine et l'hyaluronane (Dubuisson et al., 2008; Helle and Dubuisson, 2008). Parmi eux, l'HS est impliqué

dans l'attachement de nombreux virus comme le virus de la fièvre jaune ou le virus de la dengue (Germi et al., 2002b). Les HS font partie d'une famille de polysaccharides linéaires situées à la surface des cellules de mammifères et dans la matrice extracellulaire (Esko and Lindahl, 2001). Il a été montré que les glycoprotéines d'enveloppe du HCV E1 et E2 peuvent interagir avec les HS (Barth et al., 2006). De plus, l'utilisation de l'héparine, qui est un analogue des HS, et l'héparinase, une enzyme qui dégrade les HS, peuvent entraver la fixation du HCV aux cellules, démontrant leur fonction dans l'attachement viral (Haberstroh et al., 2008; Koutsoudakis et al., 2006). De même, le traitement des cellules à la glycosidase diminue l'infectiosité du HCV (Barth et al., 2006; Basu et al., 2007; Morikawa et al., 2007). Ces résultats démontrent le rôle important des HS dans la liaison du HCV aux hépatocytes. Les HS peuvent donc jouer un rôle dans l'infection par le HCV, en concentrant le virus à la surface des cellules cibles et permettant ainsi une interaction possible avec d'autres facteurs de l'hôte responsables de l'entrée virale (Morikawa et al., 2007).

c) Le récepteur aux LDL

Le HCV est capable de s'associer aux lipoprotéines de haute densité (high density lipoprotein, HDL), aux LDL et VLDL. Le LDLR a été suggéré comme important dans l'entrée du HCV (Agnello et al., 1999; Burlone and Budkowska, 2009; Wunschmann et al., 2000). De plus, le LDLR intervient à une étape précoce de l'infection des PHH par des virions du HCV dérivés du sérum (Molina et al., 2007). Le LDLR joue un rôle important dans l'homéostasie du cholestérol. Les principaux ligands du LDLR sont l'apoB contenu dans les LDL et l'apoE contenu dans les VLDL (Hishiki et al., 2010; Owen et al., 2009). Les virions du HCV semblent être internalisés par la liaison des particules virus-LDL au LDLR (Agnello et al., 1999). Par ailleurs, des anticorps dirigés contre le LDLR ainsi que des anticorps anti-apoB et anti-apoE inhibent l'endocytose du HCV (Agnello et al., 1999; Chang et al., 2007; Jiang and Luo, 2009; Wunschmann et al., 2000). Les HCVpp n'étant pas associés aux lipoprotéines, l'interaction du LDLR et des HCVpp n'a pas pu être étudiée afin de comprendre le rôle du LDLR dans l'entrée virale (Bartosch et al., 2003b). Plus récemment, en utilisant le modèle des HCVcc, il a été démontré que le LDLR pourrait participer à l'entrée non-productive de particules du HCV et que la fonction physiologique du LDLR jouerait un rôle essentiel dans la réplication du génome du HCV (Albecka et al., 2012).

## 2. Les facteurs d'entrée

La co-expression des récepteurs humains CD81, SR-BI, CLDN1 et OCLN rend des cellules non-hépatiques permissives à l'entrée du HCV, ce qui démontre que ces quatre protéines constituent l'exigence minimale comme récepteurs viraux (Da Costa et al., 2012; Dorner et al., 2011; Ploss et al., 2009).

### a) Le récepteur scavenger de classe B de type I

Une fois que le HCV a traversé l'endothélium sinusoidal et se concentre sur la membrane basolatérale des hépatocytes, le mécanisme exact des interactions entre le virus et ses "récepteurs" n'est pas entièrement compris, mais la nature riche en lipides des particules du HCV favoriserait une interaction initiale avec **SR-BI**, aussi nommé CLA-1. SR-BI est une glycoprotéine de 82 kDa avec une queue cytoplasmique C-terminale et un domaine N-terminal intracellulaire et deux domaines transmembranaires séparés par une grande boucle extracellulaire (Cocquerel et al., 2006). SR-BI fonctionne comme un récepteur de lipoprotéines multi-ligand qui est exprimé de manière ubiquitaire dans tout le corps, mais se retrouve principalement dans le foie et les glandes surrénales (Cocquerel et al., 2006). Il facilite la liaison et le transfert des lipides provenant des HDL, LDL et VLDL et compte divers rôles dans le métabolisme du cholestérol, y compris l'élimination du cholestérol non estérifié et la stéroïdogénèse (Cai et al., 2008; Krieger, 2001). Dans les hépatocytes, SR-BI sert à la capture sélective des esters de cholestérol du HDL et l'intègre dans la membrane plasmique pour maintenir l'homéostasie des lipides entre les hépatocytes et le plasma (Catanese et al., 2010). SR-BI a été identifié comme un récepteur du HCV en 2002 sur la base de l'observation que sE2 se lie efficacement à SR-BI dans les cellules HepG2 (Scarselli et al., 2002). La nature exacte de l'interaction entre E2 et SR-BI est inconnue, mais E2 se lie directement à SR-BI via son domaine HVR1 (Bartosch et al., 2005; Heo et al., 2006; Scarselli et al., 2002). Cette association pourrait induire un réarrangement membranaire ou cytoplasmique qui amène le complexe SRBI-virus proche des autres récepteurs d'entrée. De plus, des anticorps anti-SR-BI ou une diminution de l'expression de SR-BI réduit l'infection du HCV et certains génotypes ont démontré une sensibilité accrue à la neutralisation de SR-BI (Catanese et al., 2007; Dreux et al., 2006; von Hahn et al., 2006; Zeisel et al., 2007b). Il semble que SR-BI pourrait avoir de multiples fonctions dans le processus d'entrée du HCV, au cours de la phase d'attachement, mais aussi dans une étape suivant l'attachement au cours du processus d'entrée et en améliorant l'entrée (Catanese et al., 2010; Dao Thi et al., 2012; Zahid et al., 2012; Zeisel et al.,

2007b). L'association du HCV avec les lipoprotéines peut favoriser l'absorption cellulaire du virus, même en présence de nAb (Maillard et al., 2006). Les HDL augmentent l'infection par le HCV d'une manière dépendante de SR-BI (Bartosch et al., 2005; Dreux et al., 2006; Voisset et al., 2005; Voisset et al., 2006). Ces études suggèrent une relation entre le HCV et SR-BI plus complexe qu'une simple interaction virus-récepteur, car fortement dépendante de la fonction d'échange lipidique de SR-BI (Dao Thi et al., 2012; Dreux et al., 2009; Zahid et al., 2012).

Un mutant de SR-BI qui annule l'interaction avec PDZK-1, un adaptateur cytoplasmique qui régule l'expression de SR-BI et sa localisation, n'a pas d'incidence sur l'entrée du HCV (Dreux et al., 2009). SR-BI se localise dans des radeaux lipidiques membranaires de faible densité et enrichis en cholestérol (Babitt et al., 1997; Rhinds et al., 2004). Ces radeaux sont cruciaux pour le transport et l'endocytose de SR-BI qui pourrait potentialiser l'internalisation du HCV ou le ciblage de co-récepteurs, par l'intermédiaire de SR-BI (revue dans (Marsh and Helenius, 2006)). De plus, SR-BI peut également jouer un rôle dans l'internalisation du HCV en raison de sa capacité à endocyter ses ligands naturels (Wustner et al., 2004).

Par ailleurs, des nouveaux anticorps monoclonaux humains contre SR-BI ont été utilisés pour évaluer leur efficacité dans la prévention de l'infection par le HCV et la propagation de cellule à cellule *in vitro* avec des sérums de patients de différents génotypes et *in vivo*, en utilisant des souris uPA-SCID humanisées (Lacek et al., 2012; Meuleman et al., 2012). Des anticorps anti-SR-BI peuvent représenter de nouveaux outils thérapeutiques pour prévenir la réinfection par le HCV de greffes hépatiques et peuvent-être même prometteurs pour la prévention de l'échappement du virus au cours ou après un traitement antiviral (Lacek et al., 2012; Meuleman et al., 2012). De plus, l'ITX-5061 est une petite molécule qui augmente le niveau de HDL chez les animaux et les patients en inhibant SR-BI. ITX-5061 possède un mécanisme d'action unique qui empêche le HCV de pénétrer dans les cellules du foie et a démontré une puissante activité antivirale préclinique contre tous les génotypes du HCV. l'ITX-5061 a un bon profil d'innocuité dans les études toxicologiques et cliniques et est entrée en étude clinique de phase 1b (Syder et al., 2011; Wong-Staal et al., 2010).

#### b) La tétraspanine CD81

CD81 est un membre de la famille des tétraspanines, qui comprend également CD9 et CD151. Les tétraspanines sont des glycoprotéines de type III, ubiquitaires dans le corps humain. Elles sont organisées en réseau, ce qui leur permet d'interagir avec d'autres

tétraspanines ou des intégrines (Perrault and Pecheur, 2009). Elles ont plusieurs rôles de régulation dans les voies de signalisation cellulaire, y compris la prolifération, la migration et l'adhérence (Martin et al., 2005).

CD81 est une protéine de 26 kDa composée de quatre hélices hydrophobes transmembranaires séparant deux boucles extracellulaires. CD81 a été la première molécule identifiée comme interagissant avec sE2 et a donc été proposé comme un récepteur du HCV (Pileri et al., 1998). Des anticorps anti-CD81 sont capables de neutraliser l'infection de divers génotypes du HCV (Brimacombe et al., 2011) en inhibant l'interaction avec sE2 (Pileri et al., 1998; Wunschmann et al., 2000). D'autres études ont montré que la diminution de l'expression de CD81, l'inhibition par des anticorps monoclonaux anti-CD81 ou des formes recombinantes de la boucle extracellulaire EC2 de CD81 peuvent abolir l'entrée des HCVpp dans des PHH et dans des cellules hépatocytaires (Bartosch et al., 2003b; Cormier et al., 2004; Zhang et al., 2004). De plus, l'expression ectopique de CD81 dans des cellules non permissives HepG2 induit une susceptibilité à l'infection par les HCVpp (McKeating et al., 2004; Mee et al., 2009b). Des niveaux d'expression différents de CD81 peuvent affecter l'efficacité de l'infection par le HCV et un seuil minimum de CD81 à la surface cellulaire est nécessaire pour rendre les cellules du foie sensibles à l'infection du virus (Akazawa et al., 2007; Koutsoudakis et al., 2007). Une étude récente semble impliquer CD81 dans la réplication du HCV (Zhang et al., 2010). La réplication de l'ARN du HCV a lieu dans des cellules exprimant des niveaux élevés de CD81. En revanche, les cellules exprimant un niveau faible de CD81 montre une réplication réduite de l'ARN. Ces résultats suggèrent des rôles divers et multiples pour CD81 dans le cycle de vie du HCV (Zhang et al., 2010).

CD81 ne possède pas de ligand endogène, ni de motif d'internalisation, ce qui explique son faible taux d'endocytose (Berditchevski, 2001; Petracca et al., 2000). Toutefois, des données récentes suggèrent un rôle du trafic de CD81 dans l'entrée du HCV (Farquhar et al., 2012). Des anticorps anti-CD81 ainsi que l'engagement de CD81 avec le HCV favorise une internalisation dépendante de la clathrine de CD81. De plus, des anticorps anti-CD81 semblent neutraliser le HCV après son internalisation, évoquant une neutralisation de l'infection par l'intermédiaire d'un site intracellulaire. Ces données suggèrent que l'engagement de CD81 avec le HCV peut promouvoir son endocytose, qui à son tour, potentialise l'entrée du virus (Farquhar et al., 2012). Par ailleurs, des anticorps anti-CD81 ou un engagement de CD81 avec E2 peuvent activer des GTPase comme Rac, Rho et Cdc42 (cycle de division cellulaire 42), ainsi que la voie de signalisation des MAPK (mitogen-activated protein kinase) (Brazzoli et al., 2008),

pour induire un remodelage de l'actine qui permet un mouvement latéral de CD81, nécessaire pour l'entrée du HCV.

CD81 interagit avec 2 immunoglobulines EWI-F et EWI-2 (Charrin et al., 2003; Zhang et al., 2003) qui relie CD81 au cytosquelette d'actine (Sala-Valdes et al., 2006). L'expression d'un produit de clivage de EWI-2, désigné EWI-2wint, (EWI-2 sans son extrémité N-terminale) peut inhiber l'entrée des HCVpp et l'infection des HCVcc en bloquant l'interaction de CD81-E2 dans des cellules hépatocytaires (Rocha-Perugini et al., 2008; Schuster and Baumert, 2009). Cependant, le rôle d'EWI-2 dans l'entrée du HCV n'est pas clair car cette protéine n'est pas exprimée par les PHH.

Plus récemment, la protéine IFITM1 (interferon-induced transmembrane protein 1) qui est un ISG (interferon-stimulated gene) a été identifiée comme une protéine de jonction serrée des hépatocytes et une molécule anti-HCV. L'expression d'IFITM1 est induite tôt au cours du traitement par l'IFN et s'accumule au niveau des jonctions serrées dans les hépatocytes infectés par le HCV. De plus, IFITM1 interagit avec les co-récepteurs CD81 et OCLN et perturbe le processus de l'entrée virale (Wilkins et al., 2012).

Par ailleurs, CD81 est indispensable pour une infection *in vivo* par le HCV. Le traitement prophylactique avec des anticorps anti-CD81 protège complètement des souris uPA-SCID avec un foie humanisé d'une infection par le HCV de différents génotypes (Meuleman et al., 2008). Ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives pour la prévention de la réinfection du greffon après transplantation hépatique chez des patients chroniquement infectés par le HCV (Meuleman et al., 2008).

### c) La protéine jonctionnelle claudine-1

Le cloisonnement et le trafic directionnel des solutés de manière spécifique sont importants pour le bon fonctionnement de tous les organes du corps humain. Par exemple, le foie régule le débit directionnel de la bile en la séparant de l'écoulement du sang (Lima, 1980). Ce résultat est obtenu par la polarisation des tissus. Les hépatocytes ont des surfaces membranaires distinctes appelées apicales et basolatérales. Chaque surface membranaire a un profil d'expression protéique spécifique approprié pour les tâches qu'elle accomplit (Wang and Boyer, 2004). La polarité tissulaire est régulée par des protéines de jonctions serrées. Dans le foie, les jonctions serrées séparent les membranes apicales canaliculaires où s'écoule la bile et



les membranes basolatérales sinusoïdales adjacentes à la circulation sanguine (Paris et al., 2008).

CLDN1 est une protéine de 23 kDa qui appartient à la famille des protéines transmembranaires Claudine. Cette famille compte 24 membres qui partagent une structure de base, hautement conservée, composée de quatre domaines transmembranaires qui ancrent une grande et petite boucle extracellulaire (EC1 et EC2, respectivement). EC1 est responsable de la fermeture de l'espace paracellulaire et de la formation de canaux ioniques, tandis que EC2 est associée à la conformation et au positionnement de la protéine (Angelow et al., 2008). La partie C-terminale cytoplasmique de CLDN1 possède un domaine PDZ (post synaptic density protein (PSD95), Drosophila disc large tumor suppressor (Dlg1), and zonula occludens-1 protein (Zo-1)) de liaison par lequel CLDN1 interagit avec zona occludens (ZO) et se lie au cytosquelette. CLDN1 est exprimée de façon prédominante à la membrane apicale des hépatocytes, mais un pool de CLDN1 est observé au niveau des membranes basolatérales et ces protéines sont censées jouer un rôle dans l'entrée du HCV car elles co-localisent avec SR-BI et CD81 (Reynolds et al., 2008; Yang et al., 2008). En effet, en 2007, CLDN1 a été identifié comme le troisième récepteur du HCV (Evans et al., 2007). La diminution de l'expression de CLDN1 dans des cellules hépatocytaires permissives inhibe l'entrée du HCV alors que l'expression de CLDN1 dans des cellules non permissives les rend sensibles à l'entrée du HCV (Evans et al., 2007; Zheng et al., 2007). Des anticorps anti-CLDN1 neutralisent l'infection virale à une étape post-fixation (Fofana et al., 2010; Krieger et al., 2010). De plus, CLDN1 endocytose et fusionne avec les endosomes précoces exprimant Rab5 et l'infection par le HCV induit une augmentation de l'endocytose de CLDN1, ce qui suggère que le HCV pourrait moduler l'internalisation de CLDN1 lors de son entrée (Farquhar et al., 2012).

CLDN1 partage une topologie similaire aux tétraspanines et s'associe avec CD81 à la membrane plasmique et permet la formation du complexe de co-récepteurs CD81-CLDN1 qui est indispensable à l'entrée du HCV (Harris et al., 2008). Une incubation des cellules avec un inhibiteur de la protéine kinase A (PKA) (Farquhar et al., 2008) ou des anticorps anti-CD81 (Harris et al., 2008) diminue le FRET (fluorescence resonance energy transfert) entre ces deux molécules et inhibe l'entrée et l'infection du HCV. Des observations plus récentes ont montré que l'association CD81-CLDN1 est localisée à la membrane basolatérale des cellules HepG2 polarisées, tandis que CLDN1 associée aux jonctions serrées ou apicales s'associe peu avec CD81, ce qui suggère que l'association entre CD81 et CLDN1 à la membrane basolatérale potentialise l'infection par le HCV (Harris et al., 2010). Plus récemment, il a été montré que la



nature dynamique de CD81 et sa diffusion latérale permettent de réguler l'infection par le HCV d'une manière dépendante de la polarisation de la cellule (Harris et al., 2012).

Un système de complémentation de récepteur dans les cellules Huh6 qui expriment de faibles niveaux de CLDN1 endogène a été développé pour évaluer les propriétés fonctionnelles de CLDN1 (Haid et al., 2010). Les cellules Huh6 sont résistantes à l'infection par le HCV, mais l'expression de CLDN1 humaine, de hamster ou de rat permet l'entrée du HCV. En revanche, l'expression de la CLDN1 murine a montré des effets modérés. CLDN1 a été suggéré comme un facteur contribuant à la spécificité d'espèce du HCV (Haid et al., 2010) mais d'autres études ont montré que la CLDN1 humaine n'était pas indispensable à l'entrée du HCV dans les hépatocytes murins *in vivo* (Dorner et al., 2011; Ploss and Rice, 2009).

Deux autres membres de la famille Claudine, CLDN6 et CLDN9, ont été également impliqués dans l'entrée du HCV (Meertens et al., 2008; Zheng et al., 2007). L'expression de CLDN1, CLDN6 et CLDN9, mais pas d'autres membres de la famille, rendent des cellules 293T sensibles à l'entrée des HCVpp. Toutefois, CLDN6 et CLDN9 ont des niveaux d'expression dans le foie modérés et leur rôle dans l'entrée du HCV *in vivo* reste à définir.

#### d) La protéine jonctionnelle occludine

Alors que la présence de SR-BI, CD81 et CLDN1 est essentielle pour l'infection du HCV, leur expression n'est pas suffisante à l'infection par le HCV. La glycoprotéine E2 du HCV perturbe la distribution cellulaire des protéines de jonctions serrées des cellules Huh-7, résultant en leur co-localisation intracellulaire avec OCLN (Benedicto et al., 2008). Cette étude représente la première indication d'un rôle pour OCLN dans l'entrée du HCV. Le rôle d'OCLN n'a été formellement identifié qu'un an plus tard: deux études indépendantes l'impliquent dans le cycle de vie du virus. Dans la première étude, une bibliothèque à shRNA a été utilisée pour diminuer l'expression de CLDN1, OCLN et ZO-1. La réduction de l'expression de l'ensemble de ces protéines inhibe l'entrée des HCVpp et l'infection du HCVcc. Toutefois, la diminution de l'expression de ZO-1 seule n'a aucun effet sur l'entrée du HCV, alors que la modulation de CLDN1 et OCLN réduit l'entrée des HCVpp (Liu et al., 2009). De manière plus précise, l'expression de CD81 et d'OCLN humaines dans des cellules murines surexprimant les formes murines de SR-BI et CLDN1 permet une infection productive par le HCV. A l'inverse, la diminution de l'expression d'OCLN dans la lignée permissive Huh7.5 réduit l'entrée du HCV

(Ploss et al., 2009). L'OCLN représente donc à ce jour le 4ème facteur d'entrée de l'hôte indispensable du HCV.

OCLN est une protéine membranaire de 65 kDa et se compose de quatre domaines transmembranaires avec deux boucles extracellulaires. Comme CLDN1, OCLN régule les jonctions serrées et est ancrée au niveau du cytosquelette par des interactions avec des partenaires de liaison tels que ZO-1 (Feldman et al., 2005). OCLN est principalement exprimée à la membrane apicale des hépatocytes avec une expression minimale à la surface basolatérale (Mee et al., 2008). La localisation d'OCLN peut être perturbée avec des peptides pénétrant les cellules (Everett et al., 2006) et favoriserait l'entrée du HCV ce qui suggère un rôle pour OCLN intracellulaire dans l'entrée du HCV. Ces données sont compatibles avec une étude démontrant un rôle suivant l'attachement d'OCLN dans l'entrée du HCV (Benedicto et al., 2009).

L'activité de l'OCLN dépend de son état de phosphorylation et au cours de l'infection par le HCV, la dérégulation de la phosphorylation de l'OCLN conduit à une réduction de l'intégrité des jonctions serrées (TJ, tight junctions) des hépatocytes et favorise donc l'entrée du HCV (Rao, 2009). En plus de la phosphorylation des tyrosines, des résidus sérine/thréonine de plusieurs protéines sont également régulés par un type unique de modification appelé O- $\beta$ -glycosylation. Récemment, par analyse informatique des modifications post-transcriptionnelles de l'OCLN humaine, plusieurs résidus ayant ces modifications ont été identifiés. Ils servent à recruter des kinases telles que Src, EGFR ou ERK (extracellular signal-regulated kinases) (Butt et al., 2012).

### 3. Les co-facteurs

D'autres facteurs d'entrée ont été découverts récemment, dont les RTK (Lupberger et al., 2011). Grâce à un criblage à siRNA, notre laboratoire a identifié 58 nouvelles kinases comme co-facteurs d'entrée du HCV, dont l'EphA2 et l'EGFR (Lupberger et al., 2011).

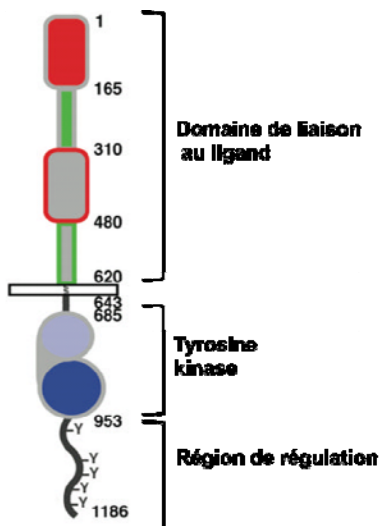
#### a) Le récepteur à l'EGF

Le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) est historiquement le prototype des RTK (Carpenter et al., 1978). C'est une glycoprotéine de 170 kDa et le premier RTK à avoir été cloné (Cohen and Carpenter, 1975; Ullrich et al., 1984), le premier pour lequel l'importance de la liaison du ligand pour la dimérisation et l'activation de l'enzyme a été

appréciée et le premier pour lequel un lien clair entre fonction aberrante du récepteur et cancer a pu être tiré (Hynes and Lane, 2005; Schlessinger, 2002). De plus, L'EGFR est fortement exprimé au niveau du foie (Schneider and Wolf, 2009).

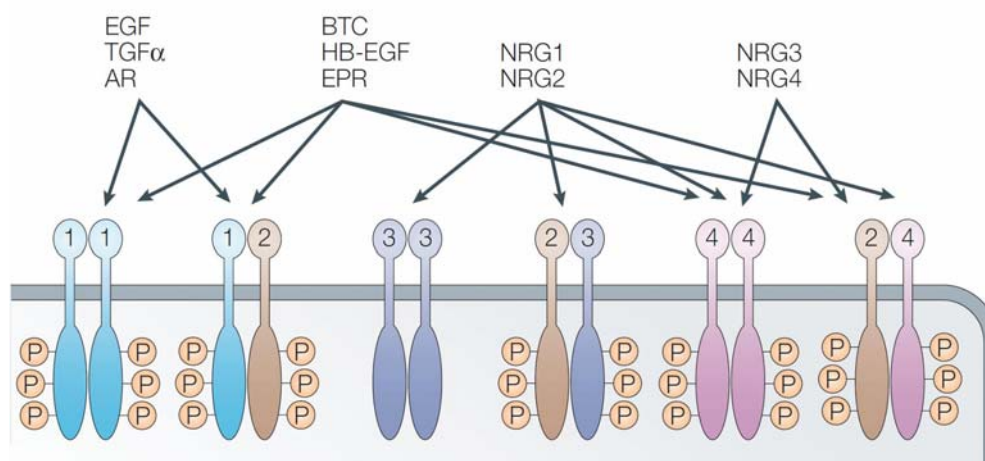
#### - Structure et physiologie

La famille de l'EGFR comprend quatre membres, désignés collectivement sous le nom de HER ou ErbB: l'EGFR (HER-1, ERbB1), ErbB2 (HER2), ErbB3 (HER3) et ErbB4 (HER4). La structure des récepteurs est conservée et partagée par les membres de la famille. L'EGFR comprend (i) une grande région extracellulaire (ectodomaine) contenant deux domaines de liaison au ligand (domaines I ou L1 et III ou L2, où 'L' signifie une répétition riche en leucine) et deux domaines d'oligomérisation (domaines II ou CR1 et IV ou CR2, où 'CR' signifie une région riche en cystéine), (ii) un domaine transmembranaire unique et hydrophobe, (iii) une région juxtamembranaire, (iv) un domaine tyrosine kinase cytoplasmique consistant en un N-lobe et un C-lobe et l'ATP se fixe à la fente formée entre ces deux lobes et (v) un domaine C-terminal régulateur qui a plusieurs résidus tyrosines pouvant être phosphorylés lors de la liaison du ligand (Hynes and Lane, 2005; Yarden and Sliwkowski, 2001). La région cytoplasmique de l'EGFR contient non seulement de nombreux sites de phosphorylation sur les tyrosines, mais également sur les sérines et thréonines (Figure 5).



**Figure 5: Structure d'un monomère de l'EGFR.** La région extracellulaire comprend 4 domaines: I-IV, parfois appelée L1, CR1, L2 et CR2. Domaines I (rouge) et III (gris avec un contour rouge) se partagent environ 37% d'identité de séquence, tandis que les domaines II (vert) et IV (en gris avec contour vert) sont riches en cystéine. Le N-lobe du domaine kinase est en bleu clair et le C-lobe en bleu foncé. Le nombre d'acides aminés sont notés pour chaque fin de domaine. Le système de numérotation conventionnelle est utilisé: l'acide aminé numéro 1 de l'EGFR est le premier acide aminé de la protéine mature. (Source : (Ferguson, 2008)).

Les ligands qui régulent les récepteurs ErbB sont nombreux. Il y a au moins sept ligands qui peuvent activer l'EGFR: l'EGF, le TGF- $\alpha$  (transforming growth factor  $\alpha$ ), l'amphiréguline, la bétacelluline, l'épiréguline et l'HB-EGF (heparin-binding EGF) (Harris et al., 2003; Hynes and Lane, 2005; Yarden and Sliwkowski, 2001). Par ailleurs, ErbB2 n'a pas de ligand soluble connu et semble jouer un rôle dans l'activation des récepteurs ErbB en formant des hétérodimères avec d'autres membres de la famille et ErbB3 dispose d'un domaine de liaison au ligand mais a une activité tyrosine kinase défectueuse (Citri et al., 2003) (Figure 6). Les ligands peuvent être synthétisés sous forme de protéines transmembranaires ou de ligands solubles libérés dans le milieu extracellulaire par l'intermédiaire d'un traitement protéolytique induit par les métalloprotéines ADAM (a disintegrin and metalloproteinase) qui sont ancrées à la membrane plasmique (Schneider and Wolf, 2009). Comme pour tous les récepteurs à activité tyrosine kinase, la liaison du ligand conduit à un changement de conformation permettant l'homo- ou l'hétéro-dimérisation. La formation des dimères est influencée par la bivalence des ligands, les affinités différentielles de liaison de ces ligands et la stabilité du complexe ligand-récepteur au pH (Beerli and Hynes, 1996; French et al., 1995). La dimérisation du récepteur est suivie d'une phosphorylation des résidus tyrosines dans le domaine intracellulaire du récepteur qui permet son activation.



**Figure 6: Les ligands de l'EGFR.** Les membres de la famille de l'EGF sont des ligands pour les récepteurs ErbB. La liaison du ligand aux récepteurs ErbB induit la formation d'homo- ou d'hétérodimères de récepteur et l'activation du domaine kinase intrinsèque, permettant la phosphorylation sur des résidus tyrosine spécifiques dans la queue cytoplasmique. Ces résidus phosphorylés vont servir de sites de liaison à une gamme de protéines et ce recrutement conduit à l'activation des voies de signalisation intracellulaire. Aucun des ligands ne se lie à ERBB2, mais ERBB2 est le partenaire privilégié pour la dimérisation de tous les récepteurs ErbB. ErbB3 n'a pas d'activité kinase et peut seulement initier une signalisation quand il est dimérisé avec un autre récepteur ErbB, comme ErbB2. 1 = ErbB1, 2 = ErbB2, 3 = ErbB3 et 4 = ErbB4. (Source: (Hynes and Lane, 2005)).

L'activation du récepteur peut aussi résulter d'une mutation, comme en témoigne le récepteur EGFRvIII tronqué ne possédant pas de domaine extracellulaire, qui présente une activité tyrosine kinase constitutive en l'absence de liaison de ligand (Moscatello et al., 1996). Une hyperactivation ou une surexpression de l'EGFR peuvent résulter en cancer: amplification génique, mutation ou réarrangement dans le gène de l'EGFR ont été démontrés dans les gliomes et plusieurs autres tumeurs malignes de l'homme, y compris la tête et du cou, du poumon, du sein et cancer (Rasheed et al., 1999).

- Trafic et endocytose

L'EGF se lie à l'EGFR avec une grande affinité, d'une manière spécifique et saturable. Cette liaison provoque l'internalisation et le tri intracellulaire du complexe récepteur-ligand et active les voies de signalisation de l'EGFR. En plus de l'EGF, d'autres ligands peuvent interagir avec l'EGFR et, lorsque ces interactions sont suffisamment stables, l'EGFR est internalisé. Les récepteurs internalisés sont délivrés à un compartiment tubulovesiculaire: l'endosome précoce (ou de tri). A partir de là, les récepteurs peuvent être recyclés vers la membrane plasmique ou sélectionnés pour dégradation lysosomale, ce qui est un processus important pour la régulation négative de la signalisation par l'EGFR, car il sépare la kinase de ses substrats cytosoliques et induit la dégradation et la régulation négative de l'expression de l'EGFR. L'EGF, qui est resté associé de manière stable à l'EGFR dans l'environnement acide des endosomes, peut maintenir l'activité kinase de l'EGFR, son ubiquitination et sa dégradation. Cependant, le TGF- $\alpha$ , qui se dissocie de l'EGFR à faible pH, induit une ubiquitination de l'EGFR transitoire et donc induit un recyclage au lieu de la dégradation lysosomale (Longva et al., 2002). L'ubiquitination joue un rôle dans la translocation de l'EGFR aux puits recouverts de clathrine (Kazazic et al., 2006; Stang et al., 2004). L'EGFR est recruté aux puits recouverts de clathrine seulement après l'activation de son activité tyrosine kinase induite par le ligand. Le recrutement de la protéine Grb2 (Growth factor receptor-bound protein 2) et l'ubiquitine ligase Cbl (Casitas B-lineage lymphoma oncogene) est nécessaire et suffisant pour induire une endocytose dépendante de la clathrine (Huang and Sorkin, 2005). Ceci s'explique par le fait que l'autophosphorylation des tyrosines Y1068 et Y1086 de l'EGFR est une condition préalable pour la liaison de Grb2 à l'EGFR (Jiang et al., 2003), et l'autophosphorylation de Y1045 est nécessaire pour la liaison de Cbl qui est nécessaire pour l'ubiquitination et le ciblage de l'EGFR dans le compartiment lysosomal (Levkowitz et al., 1998). Des études récentes ont révélé un rôle des organites d'endocytose, en particulier le compartiment endosomal tardif, comme plates-formes de signalisation pour l'EGFR (Hoeller et al., 2005; Miaczynska et al., 2004).

L'EGFR peut se relocaliser dans le noyau après irradiation, modulant potentiellement la transcription des gènes (Dittmann et al., 2005; Lin et al., 2001).

- Signalisation de l'EGFR (voir section après)

L'EGFR joue un rôle clé dans la transmission des signaux extracellulaires vers le compartiment intracellulaire. Il est maintenant bien admis que la première étape d'activation de l'EGFR implique l'induction de la dimérisation du récepteur par le ligand ou la modification d'un dimère pré-existant (Schlessinger, 2000) ce qui conduit à la stimulation du domaine kinase intracellulaire et l'autophosphorylation de tyrosines. Les tyrosines phosphorylées servent de sites de recrutement des molécules de signalisation contenant des domaines SH2 (Src Homology 2) et/ou PTB (phospho tyrosine binding) (Citri and Yarden, 2006; Pawson, 2004; Pawson and Nash, 2003; Schlessinger and Lemmon, 2003; Yaffe, 2002; Yarden and Sliwkowski, 2001). Différentes classes de protéines peuvent se lier au récepteur, par exemple des protéines adaptatrices (Grb2, Shc), des kinases (c-Src (cellular sarcoma protein), PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase)), des lipases (PLCγ (phospholipase Cγ)), ou des membres de la machinerie d'ubiquitination (Cbl). Le rôle physiologique de l'EGFR est de réguler des événements clés dans la coordination de la croissance, la différenciation et la migration cellulaire.

- Les molécules inhibitrices utilisées en clinique

Des molécules qui inactivent l'EGFR par interaction avec les régions extracellulaires ou intracellulaires de l'EGFR sont utilisées en clinique pour le traitement de différentes formes de cancers, comme les cancers colorectaux et pulmonaires (Mendelsohn and Baselga, 2006). Les deux principales stratégies d'inhibition de l'EGFR utilisent des anticorps monoclonaux anti-EGFR et/ou des petites molécules inhibitrices PKI (protein kinase inhibitor). Les anticorps monoclonaux anti-EGFR se lient au domaine extracellulaire de l'EGFR sur la surface des cellules, empêchant ainsi l'EGFR d'interagir avec ses ligands et l'activation du récepteur, ainsi que l'internalisation du complexe récepteur-ligand. En revanche, les PKI bloquent la liaison de l'ATP au domaine tyrosine kinase intracellulaire de l'EGFR, ce qui bloque l'activité kinase et la signalisation intracellulaire (Press and Lenz, 2007).

o Les anticorps monoclonaux dirigés contre l'EGFR

**Cetuximab** (Erbix, ImClone Systems, New York) est un anticorps monoclonal chimérique murin anti-EGFR qui a reçu l'approbation par la FDA (food and drug administration)

aux Etats-Unis en 2004 pour le traitement du cancer colorectal. Ce mAb se lie directement au site de liaison du ligand sur le domaine III et permet également de bloquer stériquement la dimérisation (Li et al., 2005). Le cetuximab est l'anti-EGFR le plus largement étudié et a été le premier agent anti-EGFR approuvé pour une utilisation clinique dans le traitement du cancer colorectal. Le cetuximab a une affinité supérieure pour l'EGFR que le TGF- $\alpha$  ou l'EGF (Bleeker et al., 2004; Kim et al., 2001).

**Panitumumab** (Vectibix, Amgen, Mille Oaks, Californie) est un anticorps monoclonal entièrement humanisé anti-EGFR qui a été utilisé pour des essais cliniques dans le cancer de la prostate. Il est maintenant sur le marché pour le traitement du cancer colorectal avec des formes non-mutées de KRas (Amado et al., 2008). Il agit de la même manière que le cetuximab. Le panitumumab est le premier anticorps monoclonal à démontrer l'utilisation du gène KRAS comme biomarqueur prédictif de cancer.

- o Les petites molécules inhibitrices de kinase

Les PKI de l'EGFR se lient tous sur le site de liaison de l'ATP du domaine kinase. L'erlotinib et le gefitinib se lient à la forme active de l'EGFR (Stamos et al., 2002; Yun et al., 2007). En revanche, le lapatinib se lie à et semble stabiliser les formes inactives de l'EGFR (Wood et al., 2004). Tous ces inhibiteurs sont réversibles.

**Gefitinib** (Iressa; AstraZeneca, Londres, Royaume-Uni) a été le premier PKI de l'EGFR à être approuvé par la FDA aux Etats-Unis pour le traitement du cancer du sein ou du poumon. Le gefitinib est un inhibiteur efficace de l'activité kinase de l'EGFR. Le gefitinib est également connu pour inhiber la kinase de ErbB2, mais à une dose 100 fois supérieure à celle requise pour inhiber l'EGFR (Moulder et al., 2001).

**Erlotinib** (Tarceva; OSI / Genentech, South San Francisco, CA) est le deuxième PKI de l'EGFR à avoir été approuvé par la FDA pour une application clinique dans le cancer du poumon et du pancréas. Comme le gefitinib, l'erlotinib est un inhibiteur puissant de l'autophosphorylation de l'EGFR. Comme le gefitinib, l'erlotinib a démontré une activité inhibitrice contre ErbB2 et est particulièrement efficace pour inhiber la signalisation par le mutant EGFRvIII (Akita and Sliwkowski, 2003).

**Lapatinib** est un PKI sélectif de l'EGFR et ErbB2, utilisé dans le traitement du cancer du sein et autres tumeurs solides (Burris et al., 2005).



b) Le récepteur EphA2

Les récepteurs Eph sont la plus grande famille de RTK, constituant 25% de tous les RTK connus chez l'Homme. Le premier récepteur Eph a été identifié au cours d'un criblage de RTK impliquées dans la cancérogenèse et a été nommé Eph d'après la lignée cellulaire humaine de carcinome hépatocellulaire (erythropoietin-producing hepatocellular carcinoma) dans laquelle le récepteur a été isolé (Hirai et al., 1987). Les récepteurs Eph sont répartis en deux groupes distincts: les EphA (EphA1-A10) et les EphB (EphB1-B6) basés sur une homologie de séquence du domaine extracellulaire qui détermine l'interaction avec les ligands éphrines. Les ligands peuvent aussi être divisés en deux groupes suivant la manière dont ils sont ancrés à la membrane: les ligands de classe A (ephrinA1-A6) ancrés à la membrane extracellulaire par un glycosylphosphatidylinositol et les ligands de classe B (ephrinB1-B3) qui sont des protéines transmembranaires contenant une courte région cytoplasmique (Beckmann et al., 1994; Dodelet and Pasquale, 2000; Tuzi and Gullick, 1994). En général, les ligands de classe A se lient aux EphA et ceux de classe B aux EphB.

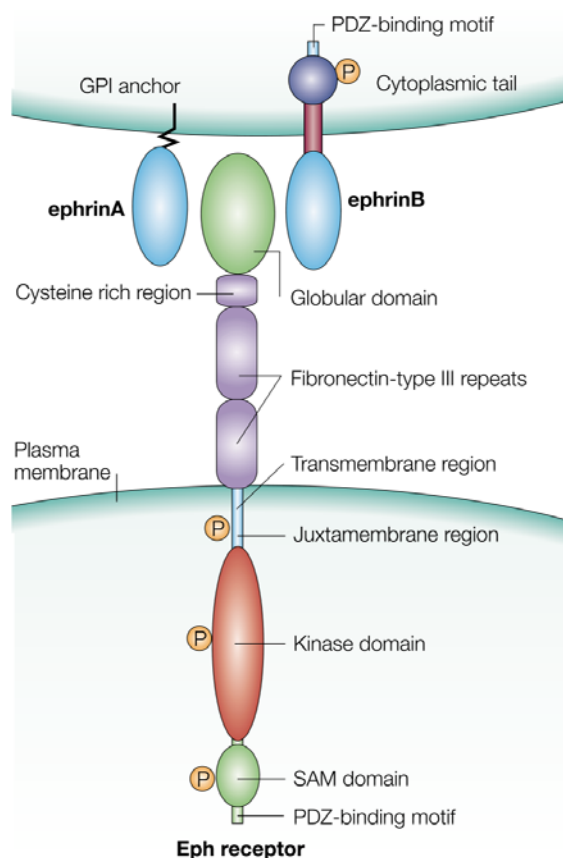
Les récepteurs Eph et les éphrines sont exprimés dans presque tous les tissus embryonnaires et sont impliqués dans le développement neuronal et vasculaire (Adams and Klein, 2000; Flanagan and Vanderhaeghen, 1998). Les récepteurs Eph et les éphrines jouent un rôle dans un certain nombre de processus biologique, y compris les interactions cellule-cellule, le réarrangement du cytosquelette d'actine, l'adhérence cellulaire, la forme et le mouvement des cellules, la migration cellulaire, l'angiogenèse et le cancer (Himanen et al., 2007; Pasquale, 2005).

Le domaine extracellulaire des récepteurs Eph est composé d'une région N-terminale globulaire, d'une région riche en cystéine et de deux répétitions de fibronectine de type III (Himanen et al., 2007; Tuzi and Gullick, 1994). Le domaine N-terminal contient un site de haute affinité qui est à la fois nécessaire et suffisant pour la liaison du ligand (Himanen et al., 2007). Le domaine intracellulaire comprend une région juxtamembranaire qui contient deux tyrosines pouvant être autophosphorylées, un domaine à tyrosine kinase, une extrémité C-terminal SAM (sterile alpha motif), qui peut servir à l'oligomérisation, et un motif de liaison PDZ qui sert de site d'ancrage pour l'interaction avec des protéines ou qui peut servir de médiateur de transduction de signaux (Lackmann and Boyd, 2008).

Suite à leur fixation au récepteur, les éphrines membranaires, ainsi que les éphrines solubles qui sont artificiellement en cluster ou dimérisées par l'addition d'anticorps anti-épitope



C-terminal ou par fusion à la partie Fc des IgG, respectivement, peuvent induire de manière efficace la phosphorylation du récepteur, résultant en un changement de conformation, une multimérisation et le regroupement de l'Eph-éphrine dans des complexes (Davis et al., 1994).



**Figure 7: Caractéristiques générales des récepteurs Eph et éphrines.** Un schéma représentant une cellule exprimant un ligand éphrine (en haut) interagissant avec cellule exprimant un récepteur Eph (en bas). Les interactions ligand-récepteur sont représentées en vert. GPI, glycosylphosphatidylinositol; SAM, sterile  $\alpha$ -motif. (Source: (Kullander and Klein, 2002)).

Le récepteur EphA2 est une glycoprotéine transmembranaire de 130 kDa, identifié pour la première fois en 1990 à la suite d'un criblage d'une banque d'ADNc de cellules épithéliales avec des oligonucléotides dégénérés conçus pour s'hybrider à des régions très conservées de RTK (Lindberg and Hunter, 1990). La même année, l'éphrine A1 a été découverte comme un nouveau facteur de nécrose tumorale inductible, ayant un poids moléculaire de 22 kDa (Holzman et al., 1990), mais uniquement identifié par la suite comme un ligand d'EphA2 (Bartley et al., 1994). Depuis, les deux protéines ont émergées comme des acteurs à part entière dans la pathogenèse du cancer, quoique de manière extrêmement complexe.

Comme Eph et éphrines sont exprimés à la membrane, les interactions récepteurs/ligands se produisent normalement à l'interface des cellules adjacentes et permettent une signalisation cellulaire dépendante du contact (Arvanitis and Davy, 2008; Himanen et al., 2007; Kullander and Klein, 2002). Une propriété importante des interactions entre récepteurs Eph et éphrine est la signalisation bi-directionnelle due à l'activation des voies de signalisation à la fois dans la cellule exprimant le récepteur et dans celle exprimant un ligand (Pasquale, 2005).

- «Forward signaling»: les récepteurs Eph sont connus pour signaler grâce à un certain nombre de voies et de molécules différentes, dont les GTPases de la famille Rho et Ras (rat sarcoma), la kinase d'adhésion focale (FAK), les voies de signalisation Jak (Janus kinase)/STAT (signal transducer and activator of transcription), PI3K et MAPK (Miao and Wang, 2009; Pasquale, 2005, 2008).

«Reverse signaling»: l'interaction entre les éphrines et les récepteurs Eph résultent non seulement dans le «forward signaling» du récepteur Eph, mais aussi dans un «reverse signaling» par l'intermédiaire du ligand éphrine lui-même (Bruckner et al., 1997).

En plus de la signalisation bidirectionnelle induite par le récepteur et son éphrine, à la fois le récepteur et le ligand sont capables d'agir indépendamment l'un de l'autre avec des molécules de signalisation (ce que l'on appelle «crosstalk»). Des interactions peuvent avoir lieu entre des Claudines et EphA2, résultant dans la régulation de l'adhérence cellulaire (Tanaka et al., 2005). De plus, des études récentes ont proposé que des membres de la famille de l'EGFR peuvent coopter EphA2 afin de promouvoir la motilité cellulaire et la prolifération, indépendamment de la stimulation par son éphrine (Brantley-Sieders et al., 2008).

Récemment, le récepteur EphA2 a été identifié comme un récepteur cellulaire d'entrée pour le KSHV via son interaction avec gH-gL (Hahn et al., 2012)

### c) Le Niemann-Pick C1-like 1

Le HCV est associée aux lipoprotéines cellulaires (LDL et VLDL) et l'infectiosité du HCV dépendante du cholestérol (Gastaminza et al., 2008) suggère l'implication de récepteurs d'absorption du cholestérol dans l'entrée cellulaire du HCV. Le NPC1L1 impliqué dans l'absorption du cholestérol cellulaire et dans l'homéostasie du cholestérol a récemment été identifié comme un co-facteur d'entrée du HCV (Sainz et al., 2012a). NPC1L1 contient 13

domaines transmembranaires, un domaine terminal conservé et de vastes sites de N-glycosylation (Yu, 2008). NPC1L1 est exprimé à la surface apicale des entérocytes et à la membrane canaliculaire des hépatocytes (Sainz et al., 2012a; Yu, 2008). Il a été démontré que la diminution de l'expression de NPC1L1 ou son inhibition par des anticorps anti-NPC1L1 diminue l'infection par le HCV (Sainz et al., 2012a). De plus, l'inhibition pharmacologique de NPC1L1 par l'ézétimibe peut réduire l'infection par le HCV par inhibition de l'étape de fusion ou avant la fusion, suggérant également que NPC1L1 peut agir au niveau des étapes suivant l'entrée virale (Sainz et al., 2012a). L'expression restreinte de NPC1L1 dans les hépatocytes humains et de primates rend ce récepteur un déterminant potentiel de tropisme du HCV (Davis et al., 2004). L'inhibition de NPC1L1 par l'ézétimibe peut retarder l'infection par le HCV dans des souris uPA-SCID (Sainz et al., 2012a), suggérant un rôle de NPC1L1 pour l'infection par le HCV *in vivo*. Ainsi, ce nouveau récepteur peut représenter une cible thérapeutique pour lutter contre l'infection par le HCV.

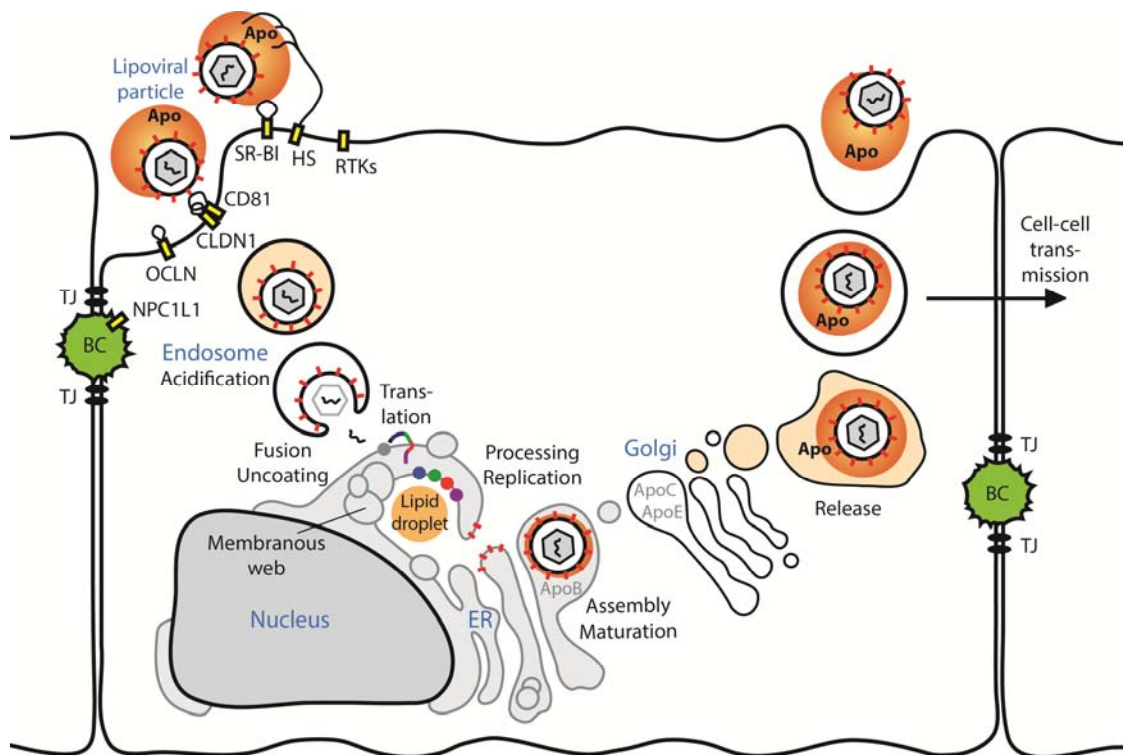
## V. Le cycle viral

Le cycle de vie du HCV est similaire à celui des autres membres de la famille des *Flaviviridae*. Les progrès réalisés dans la compréhension du cycle viral complet ont été grandement améliorés par la disponibilité d'un système de culture cellulaire qui produit un virus infectieux. Les virions extracellulaires du HCV interagissent avec les facteurs de l'hôte à la surface cellulaire, subissent une endocytose dépendante de la clathrine et l'ARN viral est libéré dans le cytoplasme. L'ARN génomique est traduit pour générer une polyprotéine qui est maturée en 10 protéines du HCV. Les protéines non structurales du HCV répliquent le génome ARN et une partie de ce nouvel ARN synthétisé est encapsidé dans des nucléocapsides et associé aux glycoprotéines d'enveloppe, conduisant à un bourgeonnement dans le RE. Les virions suivent la voie de sécrétion cellulaire et, au cours de ce transit, la maturation des particules se produit. Les virions matures sont libérés de la cellule, ce qui traduit l'achèvement du cycle viral.

### 1. Attachement et entrée

L'entrée du HCV est un processus lent et complexe en plusieurs étapes, impliquant les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 et plusieurs facteurs d'entrée cellulaires. La fixation initiale

du HCV aux cellules hôte implique l'HS, le LDLR et SR-BI. Cette interaction se fait probablement en partie par l'intermédiaire des lipoprotéines associé aux virions du HCV. Cependant, on ne peut exclure un contact direct entre les protéines de l'enveloppe et ces protéines cellulaires. Après l'attachement, la particule virale interagirait plus sélectivement avec les quatre facteurs d'entrée: SR-BI, CD81, CLDN1 et OCLN (pour revue (Zeisel et al., 2011b)). Bien que la séquence d'interaction du HCV avec ces facteurs d'entrée n'ai pas été déterminée sans équivoque étant donné que l'interaction du HCV avec CD81, SR-BI et CLDN1 a lieu à des temps très proches au cours de l'entrée virale (Zeisel 2007, Krieger 2010, Zahid 2012) et que CD81 et CLDN1 forment un complexe de récepteur nécessaire à l'entrée virale (Harris et al., 2008), il a été suggéré que le premier contact avec SR-BI pourrait être nécessaire à l'interaction avec CD81 (Helle and Dubuisson, 2008) et que CLDN1 et OCLN pourraient agir en même temps que cette interaction (Krieger et al., 2010) ou à un stade plus tardif du processus d'entrée (Evans et al., 2007; Ploss et al., 2009). Puis, le HCV est internalisé par endocytose dépendante de la clathrine et de la dynamine vers les endosomes précoces (Blanchard et al., 2006; Codran et al., 2006; Meertens et al., 2006; Tscherne et al., 2006). Le processus d'entrée se produit d'une manière dépendante du pH (Blanchard et al., 2006; Haid et al., 2009; Lavillette et al., 2006; Tscherne et al., 2006), comme précédemment démontré pour d'autres *Flaviviridae* (Hsu et al., 2003). La diminution de l'expression de CLDN1 et d'OCLN entraîne une diminution de la fusion virale, ce qui suggère un rôle possible dans le processus de fusion pour ces protéines jonctionnelles (Benedicto et al., 2009; Evans et al., 2007). Le virus est ensuite décapsidé, et l'ARN génomique du HCV est utilisé à la fois pour la traduction de la polyprotéine et la réplication dans le cytoplasme.



**Figure 8: Modèle d'entrée du HCV.** La liaison du virus à la surface cellulaire impliquerait l'héparane sulfate (HS) et le récepteur scavenger de classe B type I (SR-BI), la tétraspanine CD81 et les protéines jonctionnelles claudine-1 (CLDN1) et occludine (OCLN) seraient responsables de l'entrée du virus. Les facteurs de l'hôte récemment découverts tels que les récepteurs à tyrosine kinases (RTKs) et le NPC1L1 peuvent également contribuer au processus d'entrée. L'internalisation dépend de l'endocytose à la clathrine. La fusion entre les membranes du virus et les endosomes résulte en une libération de l'ARN génomique dans le cytoplasme où la traduction et la réplication prennent place. La transmission de cellule à cellule est une voie alternative de l'infection par le HCV. (Adapté de: (Zeisel et al., 2012)).

## 2. Traduction et réplication

Comme le HCV est composé d'un ARN de polarité positive, l'ARN viral se comporte comme un ARN messager et est donc directement traduit. La traduction de l'ARN du HCV est initiée à travers l'IRES présent dans la partie 5'UTR du HCV (Wang et al., 1993) et se produit au niveau du RE rugueux. En effet, la réplication du HCV prend place dans des membranes intracellulaires spécialisées appelées «membranous web» (Gosert et al., 2003; Huang et al., 2007). L'ARN du HCV est synthétisé par un complexe de réplication associé aux membranes qui comprend l'ARN du HCV, la polymérase ARN-dépendante NS5B, la plupart des autres protéines virales non-structurales et des protéines cellulaires (Berger and Randall, 2009; Gosert

et al., 2003). En effet, il a été démontré que la plupart des protéines du HCV, y compris NS3, NS4A, NS4B, NS5A, et NS5B, peuvent interagir les unes avec les autres, directement ou indirectement (Gao et al., 2004). Malgré les travaux effectués par plusieurs groupes, la cinétique de la formation du complexe de réplication, la composition exacte et ses fonctions sont en grande partie inconnus. Cependant, certains facteurs importants ont été identifiés, il s'agit des protéines qui régulent l'organisation du cytosquelette d'actine, le trafic des endosomes ou l'organisation des lipides membranaires (Berger and Randall, 2009).

D'autres facteurs protéiques comme des molécules chaperones ou des kinases pourraient être impliquées dans le complexe de réplication. Par exemple, les kinases cRaf (Burckstummer et al., 2006) et PI4KIII $\alpha$  (phosphatidyil inositol 4-kinase III alpha) sont des facteurs de l'hôte essentiels pour la réplication du HCV en permettant l'altération des membranes cellulaires (Berger et al., 2009). De plus, les cyclophilines sont des facteurs de l'hôte important pour la réplication virale comme la cyclophiline A (CypA) qui interagit avec NS5A (Kaul et al., 2009). Récemment, des analogues de la cyclosporine sans activité immunosuppressive inhibant les cyclophilines et démontrant une forte activité antivirale *in vitro* ont été développés (alisporivir/Debio 025, SCY-635). L'alisporivir est maintenant en étude clinique de phase 3 (Flisiak et al., 2009). De plus, le SCY-635 est un nouvel agent antiviral potentiel qui permet une sécrétion accrue de l'IFN de type I et III et qui augmente l'expression des ISG dans des cellules répliquant le HCV. Les résultats suggèrent que la restauration de la réponse immunitaire innée de l'hôte contre l'hépatite C chronique peut représenter un mécanisme important par lequel les inhibiteurs de la cyclophiline exercent leur activité antivirale (Hopkins et al., 2012). Récemment, une étude montre que la CypA se lie à un composant majeur de la réponse IFN – le facteur IRF9 (IFN regulatory factor 9). De manière intéressante, la protéine NS5A, qui est connue pour moduler la réponse IFN, est en compétition avec IRF9 pour sa liaison avec la CypA et peut empêcher la formation du complexe IRF9-CypA. La CypA se lie donc spécifiquement à un composant de la voie de signalisation JAK / STAT. Et donc une occasion nouvelle du HCV de moduler la réponse IFN via NS5A (Bobardt et al., 2012).

### 3. Assemblage et sécrétion des virions

L'assemblage viral commence probablement par l'interaction de l'ARN viral et de la protéine de capsid néosynthétisée liée à des gouttelettes lipidiques. Une fois la nucléocapside du HCV formée dans le cytoplasme, elle acquiert une enveloppe par bourgeonnement à travers

les membranes intracellulaires. La voie d'assemblage des VLDL (qui se produit dans la lumière du RE) a été identifiée comme contributeur majeur de la cellule à l'assemblage des virions (Jones et al., 2010) et la maturation des particules virales infectieuses (Gastaminza et al., 2008) (pour revue (Bartenschlager et al., 2011)). La sécrétion se fait par transfert de particules naissantes à travers la membrane du RE pour permettre l'accès aux voies de sécrétion dans les hépatocytes. La protéine core recrute les protéines non structurales et les complexes de réplication au niveau des gouttelettes lipidiques et ce recrutement est essentiel pour la production de virus infectieux (Miyanari et al., 2007).

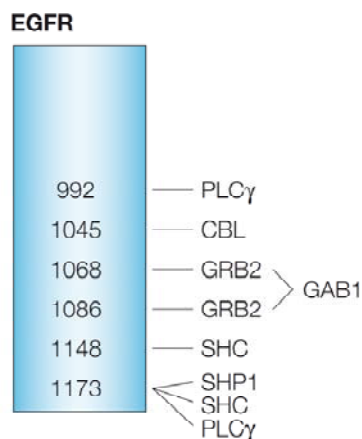
#### 4. Transmission de cellule à cellule

En plus de l'infection des hépatocytes par le virus libre décrite ci-dessus, il a été démontré qu'une autre voie d'infection existe: la transmission de cellule à cellule, appelée «cell to cell transmission» (Marsh and Helenius, 2006; Timpe et al., 2008). En effet, il a été démontré que le HCV peut être transmis directement d'une cellule infectée à une cellule adjacente par un mécanisme nécessitant également les facteurs d'entrée: SR-BI, CD81, CLDN1, OCLN, EGFR, EphA2 et probablement NPC1L1 (Brimacombe et al., 2011; Lupberger et al., 2011; Sainz et al., 2012b; Schwarz et al., 2009; Timpe et al., 2008; Zahid et al., 2012). Tandis que l'entrée du HCV est strictement dépendante de CD81, la transmission de cellule à cellule indépendante de CD81 a aussi été décrite (Brimacombe et al., 2011; Jones et al., 2010; Timpe et al., 2008; Witteveldt et al., 2009). La transmission de cellule à cellule du HCV permet au virus d'échapper aux nAb (Brimacombe et al., 2011; Timpe et al., 2008; Witteveldt et al., 2009). Ces données suggèrent un rôle de la transmission de cellule à cellule dans la persistance du virus dans le foie.

## **VI. Les voies de signalisation de l'EGFR**

La signalisation par l'EGFR commence quand un ligand se lie à un monomère, déclenchant l'homo- ou l'hétéro-dimérisation de récepteurs. Cette dimérisation induit l'autophosphorylation du domaine cytoplasmique sur des résidus tyrosines (dont Y992, Y1045, Y1068, Y1086, Y1148, et Y1173), pour fournir des sites de liaison spécifiques pour des protéines contenant des domaines SH2 et/ou PTB, qui servent d'adaptateurs à des protéines impliquées dans la transduction du signal (Figure 9). L'activation en chaîne de ces cascades de signalisation conduit à l'activation de facteurs de transcription tels que c-fos, c-jun, c-myc ou STAT. Ceux-ci entrent dans le noyau de la cellule et induisent la transcription de gènes cibles

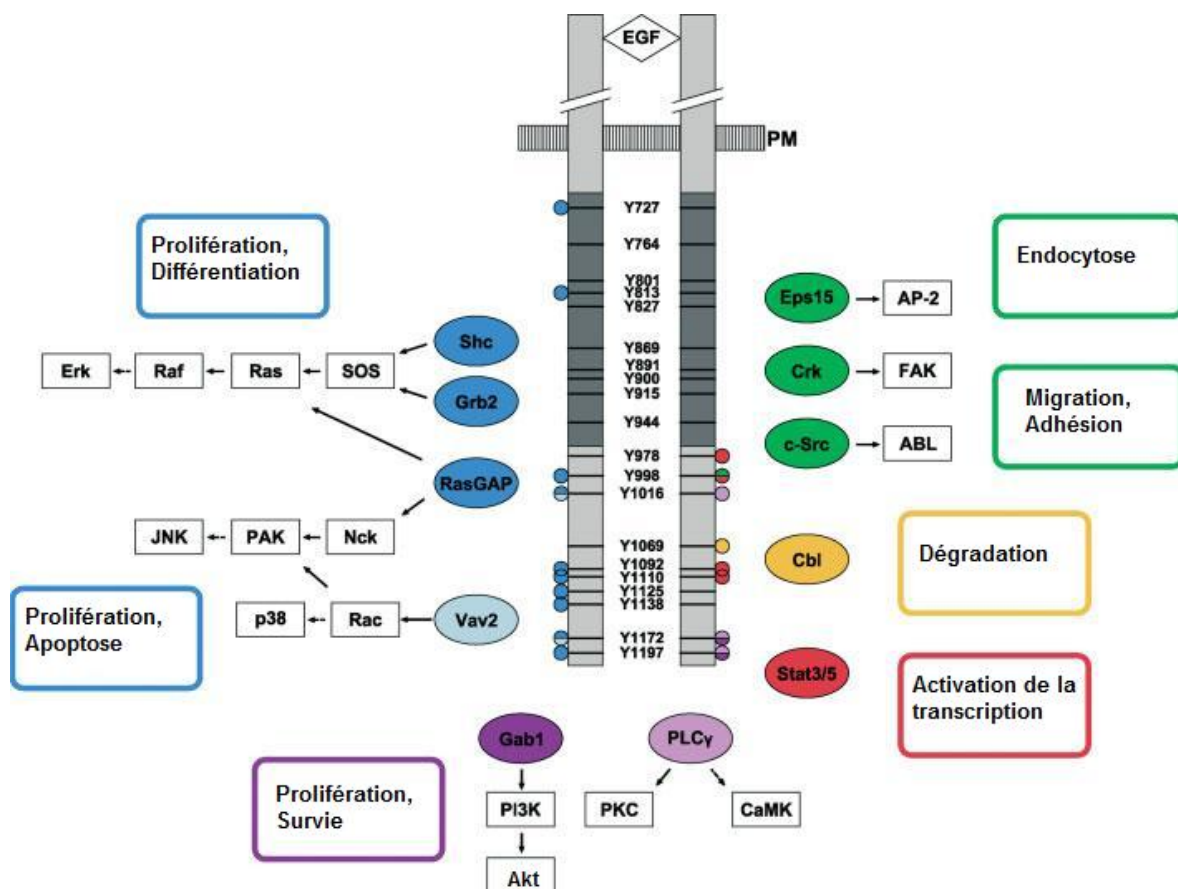
menant à la régulation de processus cellulaires variés (Hynes and Lane, 2005; Yarden and Sliwkowski, 2001).



**Figure 9:** Représentation schématique des principaux sites d'autophosphorylation de l'EGFR et des molécules de signalisation associés à ces sites. (Source: (Hynes and Lane, 2005)).

Plusieurs voies de signalisation importantes sont induites par l'EGFR, y compris la voie de signalisation des MAPK (Kolch, 2000), de la PI3K/Akt (Fayard et al., 2005), de Jak/STAT (Andl et al., 2004), de la PLC $\gamma$ /PKC (protéine kinase C) (Patterson et al., 2005) et de Src/FAK (Ishizawa and Parsons, 2004; Sieg et al., 2000). D'autres protéines de liaison à l'EGFR sont impliquées dans la régulation de la signalisation du récepteur par l'endocytose, comme Eps15 (EGFR pathway substrate 15) (Salcini et al., 1999), ou dans sa dégradation initiée par la liaison de Cbl (Swaminathan and Tsygankov, 2006) (Figure 10). Ces protéines ne sont que quelques exemples parmi les molécules de signalisation impliquées dans la signalisation de l'EGFR. Au total, plus de 100 protéines interagissant avec l'EGFR ont été décrites dans la littérature.





**Figure 10: Les voies de signalisation principales de l'EGFR.** Les sites de phosphorylation sur tyrosines de l'homodimère d'EGFR activé par l'EGF sont indiqués par des barres noires. Les sites de liaison connus sont étiquetés avec des cercles colorés, les couleurs correspondantes indiquent les partenaires d'interaction directe, ainsi que les fonctions biologiques associées. Le domaine kinase du récepteur est représenté en gris foncé. PM, membrane plasmique. (Adapté de: (Morandell et al., 2008)).

### 1. La voie PI3K/Akt

La voie PI3K/Akt régule la croissance cellulaire, la résistance à l'apoptose, de même que l'invasion tumorale, et la migration cellulaire (Vivanco and Sawyers, 2002).

La PI3K est une enzyme dimérique composée d'une sous-unité régulatrice (p85) et d'une sous-unité catalytique (p110). La p85 peut être directement associée à l'EGFR grâce à l'interaction de son domaine SH2 avec des résidus phosphotyrosines ou via un recrutement de la protéine Gab1 (Yu et al., 1998). La sous-unité p110 catalyse la phosphorylation de son substrat le phosphatidylinositol 4,5-diphosphate en phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate, qui à son tour recrute et active les kinases à sérine/thréonine contenant un domaine PH (pleckstrin

homology) comme Akt (également appelée PKB (protein kinase B)) et PDK1 (phosphoinositide-dependent kinase 1) (Cantley, 2002; Stokoe et al., 1997).

## 2. La voie STAT

L'EGFR est aussi capable de réguler les voies de signalisation de STAT via la kinase Jak ou par un mécanisme indépendant de Jak (Andl et al., 2004). Les protéines STAT sont une famille de facteurs de transcription cytoplasmiques qui existent en tant que monomères inactifs. Les protéines STAT interagissent avec des résidus phosphotyrosines via leur domaine SH2 et, lors de la dimérisation, sont transloquées vers le noyau ou elles induisent l'expression de gènes cibles spécifiques (Darnell, 1997). La transcription des gènes entraîne la production de protéines qui interviennent dans des réponses cellulaires, notamment la prolifération, la migration, l'adhérence, la différenciation et l'apoptose.

## 3. Les voies des MAPK

Les voies des MAPK sont des voies de signalisation très conservées et elles sont impliquées dans diverses fonctions cellulaires, y compris la prolifération, la différenciation cellulaire et l'apoptose. La famille des MAPK comprend plusieurs sous-groupes de kinases telles que p38, JNK (c-Jun terminal kinase) et Erk. Toutes ces molécules ont en commun la propriété d'être activées par phosphorylation, ce qui leur permet de phosphoryler à leur tour sur des résidus sérine et thréonine une large gamme de substrats, y compris d'autres kinases, des phospholipases et des facteurs de transcription (Chang and Karin, 2001; Johnson and Lapadat, 2002).

Les cascades de signalisation de p38 et JNK sont fortement activées par le stress et les cytokines inflammatoires, tandis que celle d'Erk est fortement activée par les facteurs de croissance via des RTK (Kyriakis and Avruch, 2001).

### a) La voie MAPK-p38

Le premier membre de la famille MAPK-p38 a été identifié comme une protéine de 38 kDa (p38) qui est rapidement phosphorylée sur des résidus tyrosines en réponse au LPS (lipopolysaccharide) (Han et al., 1994). Il existe en réalité quatre isoformes de p38 chez les mammifères, qui sont identiques à 60% dans leur séquence en aa: p38 $\alpha$ , p38 $\beta$ , p38 $\gamma$  et p38 $\delta$ .

Les isoformes p38 $\alpha$  et p38 $\beta$  sont exprimées de manière ubiquitaire, tandis que p38 $\gamma$  et p38 $\delta$  ont une expression restreinte au muscle, à la peau, aux cellules rénales et aux glandes endocrines.

La cascade de signalisation de p38 implique l'activation séquentielle des MAPK kinase kinases (MAP3K), tels que MTK1 (MAP three kinase 1), MLK-2 (mixed-lineage kinase-2), DLK (dual leucine zipper-bearing kinase), ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1) et TAK1 (transforming growth factor-activated kinase 1) et des MKKS (mitogen-activated protein kinase kinase) dont MKK3, MKK4 et MKK6. Une activation MKK-indépendante de p38 a également été observée (Ashwell, 2006). De nombreux substrats de p38, y compris des protéines kinases à sérine/thréonine, des facteurs de transcription et des régulateurs du cycle cellulaire ont été identifiées (Han and Sun, 2007; Hui et al., 2007; Wagner and Nebreda, 2009)

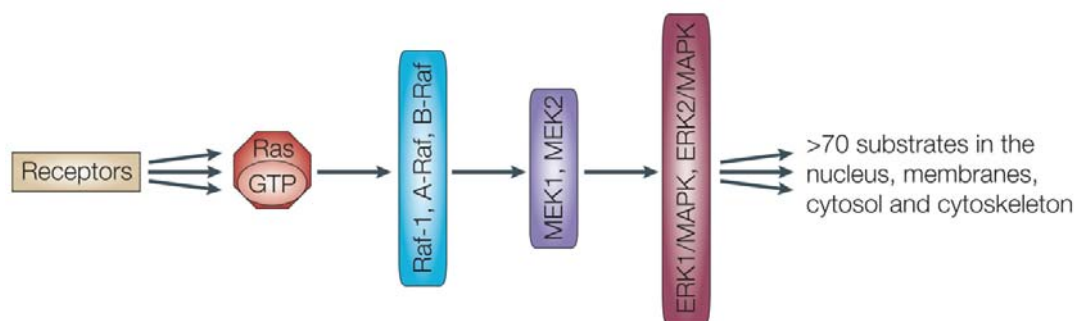
#### b) La voie MAPK-JNK

Les kinases JNK1/2/3 ont été découvertes comme pouvant se lier et phosphoryler la protéine c-Jun et augmenter son activité transcriptionnelle. c-Jun est une composante du complexe de transcription AP-1 (activator protein 1), qui est un important régulateur de l'expression de gènes. AP-1 contribue au contrôle de plusieurs gènes de cytokines et est activé en réponse à un stress environnemental et facteurs de croissance. L'activation complète de JNK exige une double phosphorylation sur des résidus thréonine et tyrosine par les kinases MAP2K: MKK4/7 (Wada et al., 2004). Ces kinases ont été préalablement activées par les kinases MAP3K, tels que ASK1, TAK1, MEKK1, et MEKK4. Ces MAP3K sont activées par des kinases en amont, y compris Cdc42 et Rac1, qui dépendent d'une variété de récepteurs de détection du stress et de l'inflammation (Davis, 2000; Wagner and Nebreda, 2009). Par conséquent, une diversité de stimuli peut activer la voie MAPK-JNK. En plus du stress, la voie JNK est activée par des cytokines pro-inflammatoires comme l'interleukine-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$ , et des facteurs de croissance. De plus, la voie JNK peut être activée suite à l'activation du récepteur de type Toll (par exemple TLR-4 et TLR-9) par des pathogènes (Weston and Davis, 2007) ce qui joue un rôle important dans les réponses immunitaires innées.

#### c) La voie MAPK-Erk

La voie MAPK-Erk est une des voies de signalisation majeure de l'EGFR et elle est activée, après stimulation de l'EGFR, qui permet le recrutement direct de Grb2 aux tyrosines phosphorylées Y1068 et Y1086 via son domaine SH2 (Okutani et al., 1994). Cette interaction entraîne un changement de structure en trois dimensions de Sos, conduisant au recrutement de

Ras-GDP et permettant son activation (Ras-GTP), qui à son tour se lie et active la kinase Raf (c-Raf ou Raf1, BRaf, or A-Raf), qui à son tour déclenche la phosphorylation de MEK (mitogen-activated ERK kinase) et Erk. Erk phosphorylée est transloquée dans le noyau et régule la transcription de différents facteurs, ainsi induisant la prolifération et la migration cellulaire (Hallberg et al., 1994; Liebmann, 2001; Sebolt-Leopold and Herrera, 2004) (Figure 11).



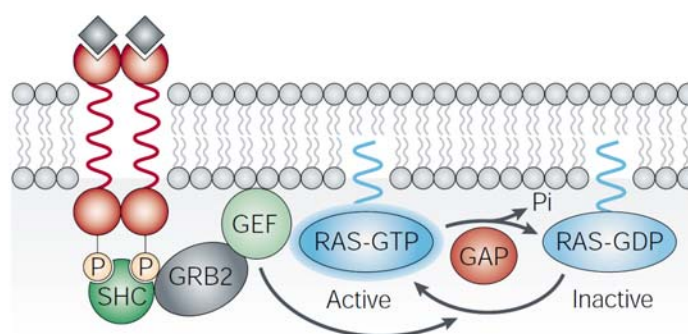
**Figure 11: La plupart des RTK active les GTPases Ras.** La plupart des membres de la famille des GTPases Ras résident à la membrane plasmique et font la navette entre les protéines inactives liées au GDP et actives liées au GTP. Les membres les mieux caractérisés sont KRas, HRas et NRas, qui sont codés par des proto-oncogènes puissants. Dans sa conformation activée, Ras-GTP peut se lier à un certain nombre de molécules effectrices, y compris la sérine/thréonine kinase Raf, la PI3K et d'autres protéines. Ras-GTP recrute ces protéines à la membrane, ce qui est crucial pour leur activation et la fonction de signalisation. Les trois membres de la famille Raf, ARaf, BRaf et Raf-1, se lient à Ras-GTP et c'est la première étape de leur processus d'activation. Alors que l'association à Ras-GTP pourrait suffire pour activer BRaf, à la fois Raf-1 et ARaf font l'objet d'une série complexe d'étapes d'activation qui n'ont pas été entièrement élucidées et impliquent des changements dans les niveaux de phosphorylation de protéines. Toutes les isoformes de Raf peuvent activer la kinase MEK en phosphorylant deux sérines. BRaf est beaucoup plus efficace que Raf-1, qui est plus efficace qu'ARaf. Erk est le seul substrat connu de MEK, qui est activée par phosphorylation de deux résidus thréonine et tyrosine. Erk est considérée comme le principal effecteur de la voie des MAPK et a plus de 70 substrats connus qui comprennent des facteurs nucléaires de transcription, des protéines du cytosquelette, des protéines et des récepteurs de signalisation (Source: (Kolch, 2005)).

#### - La petite GTPase HRas

La famille des petites GTPases Ras se compose de HRas, KRas et NRas. Les isoformes de Ras sont de petites GTPases de 21 kDa localisées à la surface interne de la membrane plasmique. Ce sont des protéines de liaison au GDP/GTP qui agissent comme des capteurs de signaux intracellulaires (Vetter and Wittinghofer, 2001). La forme active liée au GTP interagit avec une variété de protéines effectrices. Les gènes Ras sont des proto-oncogènes mutés dans différents types de cancers humains. La grande majorité de ces mutations oncogéniques affectent les résidus aa G12, G13 et, plus rarement, Q61 (Bamford et al., 2004).

Ils provoquent l'accumulation de Ras dans l'état actif lié au GTP en portant atteinte à l'activité GTPase intrinsèque et conférant une résistance à l'inhibition.

Les mutations de HRas ont été principalement trouvés dans les carcinomes de la vessie et du sein (Fujita et al., 1984; Kraus et al., 1984). La mutation dans le codon 12 résulte en une glycine qui devient valine et active constitutivement le domaine GTPase et active la voie des MAPK.



**Figure 12: Signalisation en amont de la GTPase Ras.** L'état d'activation de Ras est contrôlé par le cycle de l'hydrolyse du GTP lié, qui est catalysée par des protéines GAP (GTPase activating proteins), et le remplacement du GDP lié par du GTP, ce qui est catalysé par la protéine GEF (guanine nucleotide exchange factor). Le mécanisme d'activation le plus étudié comprend l'assemblage de complexes de RTK autophosphorylés et activés avec le GEF SOS via la protéine adaptatrice Grb2 et, éventuellement, SHC, aboutissant au recrutement de SOS à la membrane plasmique, où Ras est situé. Plusieurs autres GEF existent qui ont un mécanisme de régulation distinct. De plus, un large éventail de GAP a été identifié pour Ras. (Source: (Downward, 2003)).

## VII. Le virus de l'hépatite C, l'EGFR et les voies de signalisation

Il a été montré que des kinases cellulaires peuvent réguler différents mécanismes d'absorption de virus, y compris l'endocytose dépendante de la clathrine (Pelkmans et al., 2005), l'endocytose dépendante des cavéoles, ainsi que la macropinocytose. De plus, les virus profitent du réseau de signalisation intracellulaire de différentes façons, modifiant à la fois l'activité tyrosine kinase du récepteur et l'expression de gènes.

### 1. La protéine core

En plus de la formation de la nucléocapside, la protéine core est impliquée dans de nombreuses voies de signalisation et peut moduler plusieurs processus cellulaires, y compris l'activation transcriptionnelle modifiant l'expression de certains gènes, l'apoptose et la transformation

cellulaire (Lai and Ware, 2000). De plus, core active la voie des MAPK (Giambartolomei et al., 2001). L'expression constitutive de core dans des lignées cellulaires conduit à une activité basale de Raf et de MEK, ainsi qu'à l'hyperphosphorylation et à l'activation d'Erk, indépendamment des mitogènes de signalisation (comme l'EGF ou le TGF- $\alpha$ ) (Hayashi et al., 2000). Core améliore également l'activation d'Elk-1 dans des lignées cellulaires, sans affecter l'activité d'Erk ou la phosphorylation d'Elk-1, plaçant l'effet de core en aval de MEK (Fukuda et al., 2001). Core peut aussi directement interagir avec STAT3 et l'activer (Yoshida et al., 2002).

Récemment, un motif YXX $\Phi$  (où  $\Phi$  est un résidu hydrophobe volumineux) jusqu'à présent inconnu, a été identifié dans la protéine core. Ce motif est homologue aux signaux de tri contenus dans les protéines cargo de l'hôte permettant la liaison de la sous-unité  $\mu$  du complexe d'adaptateur de la clathrine AP-2 (AP2M1). Core se lie à AP2M1 et permet l'assemblage viral par recrutement d'AP2M1 aux gouttelettes lipidiques. De plus, AAK1 et GAK, des kinases à sérine/thréonine, connues pour stimuler la liaison d'AP2M1 aux protéines cargos, régule la liaison de core-AP2M1 et sont indispensables pour l'assemblage du HCV. Des anti-cancéreux qui inhibent l'activité d'AAK1 ou GAK perturbent non seulement la liaison core-AP2M1, mais inhibent également l'assemblage du HCV et la production de virus infectieux (Neveu et al., 2012).

## 2. La protéine NS3

La protéine NS3 se lie à la PKA et à la PKC qui sont impliquées dans des voies de signalisation différentes (Borowski et al., 1999). L'infection par le HCV bloque la signalisation antivirale de l'IFN par un clivage de Cardif par NS3-4A (Meylan et al., 2005). De plus, NS3-4A a aussi la capacité de cliver la protéine TC-PTP (T cell protein tyrosine phosphatase). Le clivage de cette protéine pourrait stimuler l'activation de l'EGFR et augmenter ainsi la réplication du HCV. Cependant, le mécanisme par lequel l'inhibition de TC-PTP pourrait avoir un effet positif sur la réplication du HCV n'est pas encore connu (Brenndorfer et al., 2009).

## 3. La protéine NS5A

La protéine NS5A est également impliquée dans la régulation de la croissance cellulaire et dans des voies de signalisation cellulaire de l'hôte (Tan and Katze, 2001). Un indicateur que NS5A peut avoir un rôle dans la signalisation cellulaire est la présence de motifs polyprolines

(PXXP), qui sont très conservés au sein des génotypes du HCV. Ces motifs forment des structures hélicoïdales étendues et se retrouvent dans un certain nombre de protéines virales et cellulaires impliqués dans la transduction du signal. Ils se lient au domaine SH3 trouvés dans un groupe diversifié de molécules de transduction de signal (Williamson, 1994). Un autre domaine de signalisation de NS5A bien caractérisé qui sert de médiateur des interactions protéine-protéine est le domaine SH2, qui se lie aux séquences contenant des phosphotyrosines. NS5A se lie à certaines protéines cellulaires impliquées dans l'endocytose de l'EGFR. Par exemple, l'un des motifs PXXP de NS5A interagit directement avec les domaines SH3 de Grb2 (Tan et al., 1999), un composant de la voie de signalisation des MAPK et réduit la phosphorylation d'Erk ou avec la sous-unité p85 de la PI3K (He et al., 2002) ou encore avec la p53 (Majumder et al., 2001), pouvant déclencher une dérégulation de la transduction du signal dans la cellule. De plus, NS5A inhibe l'activation de la voie de signalisation Ras/Erk stimulée par l'EGF (Tan et al., 1999; Vieira et al., 1996). Dans les cellules exprimant NS5A, la phosphorylation d'Erk résultant de la stimulation de l'EGFR est réduite. Néanmoins, le mécanisme exact n'est pas clair et proviendrait d'une réduction des interactions de Grb2 et Sos (son of sevenless) (Georgopoulou et al., 2003; Macdonald et al., 2003). NS5A peut être exprimée dans les endosomes précoces, co-localisant fortement avec l'EGFR et modifiant sa distribution. Cette redistribution de l'EGFR entraîne une diminution des complexes actifs ligand-récepteur présents dans le compartiment endosomal tardif, censé être une condition essentielle pour la stimulation de la voie de signalisation Ras/Erk. En inhibant ce transport endosomal tardif, NS5A atténue la dégradation de l'EGFR dans les cellules infectées par le HCV (Mankouri et al., 2008). NS5A peut aussi se lier à la kinase Raf-1 (ou cRaf) (Burckstummer et al., 2006).

#### 4. La protéine NS5B

Récemment, c-Src, un membre de la famille des kinases Src, qui participe à de nombreuses voies de transduction du signal, a été identifié comme un facteur de l'hôte essentiel à la réplication virale. En effet, c-Src interagit directement avec NS5B par l'intermédiaire de son domaine SH3 et avec NS5A via son domaine SH2. c-Src participe à la formation d'un complexe protéique NS5A/NS5B qui est nécessaire à la réplication efficace du HCV (Pfannkuche et al., 2011).



## **OBJECTIFS**

L'infection par le HCV est un problème majeur de santé publique car ce virus infecte environ 170 millions de personnes dans le monde. Après l'infection initiale, le HCV persiste chez environ 80% des individus en dépit de la présence d'une immunité cellulaire et humorale. L'hépatite C chronique aboutit à une cirrhose du foie et au développement du HCC, qui est une indication principale de transplantation hépatique, mais le greffon est systématiquement ré-infecté. Le traitement antiviral actuel de l'hépatite C chronique est basé sur une combinaison d'IFN- $\alpha$  pégylé et de ribavirine. Ce traitement n'est pas prescrit à tous les patients en raison d'effets secondaires importants, il n'est pas efficace chez tous les patients et est toujours limité par la résistance, et des coûts élevés. Récemment, deux DAA (bocéprévir et télaprévir) ciblant la protéase du HCV, ont été approuvés pour le traitement de patients infectés par le génotype 1 en combinaison avec l'IFN- $\alpha$  pégylé et la ribavirine (tri-thérapie). Ces médicaments sont chers et comme ils sont dirigés contre le virus, une résistance virale a été observée. Le développement de molécules mieux tolérées et plus efficaces est donc nécessaire (Pawlotsky, 2011; Sarrazin et al., 2012).

L'entrée du HCV est nécessaire à l'initiation, la propagation et le maintien de l'infection et représente donc une cible intéressante pour de nouvelles stratégies antivirales. Plusieurs facteurs d'entrée de l'hôte nécessaires à l'entrée virale ont été décrits au cours des dernières années, y compris SR-BI, CD81, CLDN1 et OCLN. Pourtant le mécanisme détaillé de l'entrée du HCV par endocytose dépendante de la clathrine n'est pas complètement élucidé.

Récemment, en collaboration avec la plateforme Transfected Cell Array (TCA) du Canceropôle du Grand Est, le Centre Européen de Biologie et de Génomique Structurale (CEBSC) et l'Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC) de Strasbourg, le laboratoire a effectué un criblage fonctionnel à ARN interférant (RNAi) pour identifier des kinases cellulaires pouvant jouer un rôle dans l'entrée du HCV. En utilisant des HCVpp mimant les étapes d'entrée du HCV, 58 kinases de la cellule hôte ont été identifiées, y compris deux RTK: l'EGFR et l'EphA2, qui jouent un rôle significatif et spécifique au cours de l'entrée du HCV.

Dans la première partie de ma thèse, nous avons cherché à identifier les mécanismes moléculaires dépendant de l'EGFR, de l'EphA2 et de leurs ligands respectifs lors de l'entrée du



HCV et à examiner la pertinence de l'EGFR et de l'EphA2 en tant que cible antivirale potentielle en utilisant des anticorps monoclonaux ou des inhibiteurs (**publication n°1 : EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy.** Lupberger J\*, Zeisel M.B\*, Xiao F, Thumann C, Fofana I, **Zona L**, Davis C, Mee CJ, Turek M, Gorke S, Royer C, Fischer B, Zahid MN, Lavillette D, Fresquet J, Cosset FL, Rothenberg SM, Pietschmann T, Patel AH, Pessaux P, Doffoël M, Raffelsberger W, Poch O, McKeating JA, Brino L, Baumert TF. *Nat Med.* 2011 May;17(5):589-95. (\* contribution équivalente).

En tant que parasites obligatoires des processus cellulaires, les virus doivent prendre avantage de la machinerie cellulaire de l'hôte. De plus, les virus peuvent contrôler les voies de signalisation intracellulaire par interaction direct ou indirect avec des kinases et/ou des phosphatases (Dunn and Connor, 2012). Ce contrôle de phosphoprotéines cellulaires est important pour promouvoir une variété de processus viraux, comme le contrôle de l'entrée, la stimulation de la synthèse des protéines virales et l'export. Il a été montré que des kinases cellulaires peuvent réguler différents mécanismes d'absorption de virus, y compris l'endocytose dépendante de la clathrine (Schelhaas, 2010). En effet, notre laboratoire a montré que l'entrée du HCV dépendait de l'expression et de la fonction de l'EGFR et de l'EphA2 (Lupberger et al., 2011).

Dans la deuxième partie de ma thèse, nous avons donc cherché à caractériser l'impact des voies de signalisation de l'EGFR sur le processus d'entrée du HCV et en particulier le lien moléculaire entre les voies de signalisation activées par l'EGFR et la régulation de l'association du complexe de co-récepteur CD81-CLDN1 (**publication n°2 : HRas signal transduction promotes hepatitis C virus cell entry by triggering assembly of the host tetraspanin receptor complex.** **Zona L**§, Lupberger J§, Sidahmed-Adrar N#, Thumann C#, Harris H.J, Barnes A, Florentin J, Tawar R.G, Xiao F, Turek M, Durand S.C, Duong F.H.T, Heim M.H, Cosset F-L, Hirsch I, Samuel D, Brino L, Zeisel M.B, Le Naour F, McKeating J.A, Baumert T.F, *Cell Host Microbe.* 2013 Mar 13;13(3):302-13. (§,# contribution équivalente).

## RESULTATS

### **I. Partie 1: Mécanismes moléculaires dépendants de l'EGFR et de l'EphA2 lors de l'entrée du HCV**

**Publication n°1:** EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy.

Lupberger J\*, Zeisel M.B\*, Xiao F, Thumann C, Fofana I, **Zona L**, Davis C, Mee CJ, Turek M, Gorke S, Royer C, Fischer B, Zahid MN, Lavillette D, Fresquet J, Cosset FL, Rothenberg SM, Pietschmann T, Patel AH, Pessaux P, Doffoël M, Raffelsberger W, Poch O, McKeating JA, Brino L, Baumert TF. (\* contribution équivalente).

*Nature Medicine*, 2011, volume 5, pages 589 à 595 (en annexe).

#### 1. Les RTK de l'hôte sont des co-facteurs d'entrée du HCV

Un criblage à RNAi réalisé par notre équipe a permis d'identifier un réseau de 58 kinases ayant un impact fonctionnel sur l'entrée du HCV. Parmi ces kinases l'EGFR et l'EphA2 ont été identifiés comme des co-facteurs d'entrée et d'infection du HCV. Au cours de cette étude, nous nous sommes concentrés sur ces RTK parce qu'ils sont des éléments clés dans le réseau identifié, qu'ils sont fortement exprimés dans le foie humain et leur fonction kinase peut être inhibée par des PKI cliniquement approuvés (Li et al., 2010; Shepherd et al., 2005), ce qui nous permet d'explorer le potentiel de ces récepteurs en tant que cibles thérapeutiques.

Dans un premier temps, nous avons utilisé des PKI pour étudier l'impact fonctionnel des RTK identifiés sur l'entrée et l'infection par le HCV. L'erlotinib (un inhibiteur de l'EGFR) et le dasatinib (un inhibiteur d'EphA2) altèrent fortement l'entrée et l'infection du HCV, d'une manière dépendante de la dose. L'inhibition de l'activité kinase de ces récepteurs diminue aussi largement l'infection par tous les génotypes majeurs du HCV, ainsi que par des variants d'échappement viral en culture cellulaire. L'importance de ces RTK dans la transmission de cellule à cellule et la propagation virale a aussi été étudiée. L'erlotinib et le dasatinib bloquent la transmission de cellule à cellule du HCV et empêche également la propagation du virus dans le système des HCVcc lorsqu'il est ajouté après l'infection. Les PKI réduisent donc la propagation du virus, ce qui suggère une fonction clé de ces RTK dans la transmission du HCV de cellule à cellule et dans sa diffusion. Pour étudier la pertinence *in vivo* des interactions virus-hôte

identifiées, nous avons évalué l'effet de l'erlotinib sur l'infection par le HCV *in vivo*, dans le modèle murin chimérique ayant un foie humain. Le traitement par l'erlotinib retarde la cinétique de l'infection du HCV ce qui suggère que l'erlotinib possède une activité antivirale et que l'EGFR agit comme un co-facteur d'entrée et de diffusion du HCV *in vivo*. En collaboration avec le laboratoire de J.A. McKeating à Birmingham, Royaume Uni, l'utilisation de techniques de FRET a permis de mesurer la distance moléculaires à la membrane entre deux protéines d'intérêt marquées, à savoir les facteurs d'entrée CD81 et CLDN1 (Harris et al., 2010; Harris et al., 2008; Mee et al., 2009a). Les résultats de FRET suggèrent que l'EGFR et l'EphA2 régulent la formation du complexe de co-récepteurs CD81-CLDN1 qui est essentielle pour l'entrée du HCV (Harris et al., 2010). Comme nos essais cinétiques ont montré que les PKI inhibent des étapes tardives lors de l'entrée virale, nous avons étudié l'impact de ces kinases dans la fusion cellulaire de la glycoprotéine virale, en collaboration avec le laboratoire de F.L.Cosset à Lyon (Lavillette et al., 2007). Les résultats suggèrent que l'EGFR et l'EphA2 sont impliqués dans la fusion membranaire virale glycoprotéine-dépendante lors de l'entrée du HCV. Les RTK identifiés augmentent l'entrée du HCV grâce à la régulation de la formation du complexe de co-récepteurs CD81-CLDN1 et la fusion membranaire virale et donc que les RTK agissent à des étapes suivant l'attachement lors de l'entrée virale.

Dans la première partie de ma thèse, je me suis intéressée à étudier l'impact des kinases identifiées sur le cycle de vie du HCV. J'ai plus précisément validé et caractérisé l'impact fonctionnel de l'EGFR et de l'EphA2 sur l'entrée du HCV en étudiant l'effet de ligands et d'anticorps spécifiques de ces récepteurs.

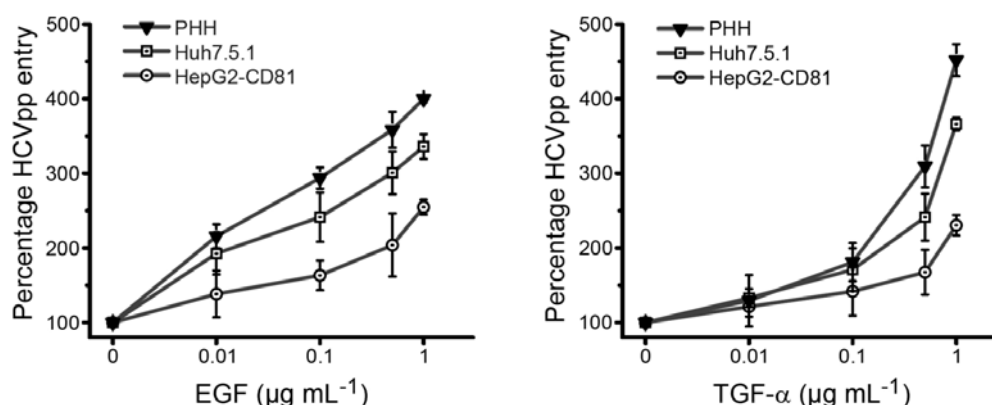
## 2. Des ligands spécifiques aux RTK modulent l'entrée du HCV

J'ai évalué l'entrée du virus en présence de ligands spécifiques aux RTK dans des modèles de culture cellulaire.

### a) Les ligands de l'EGFR stimulent l'entrée du HCV

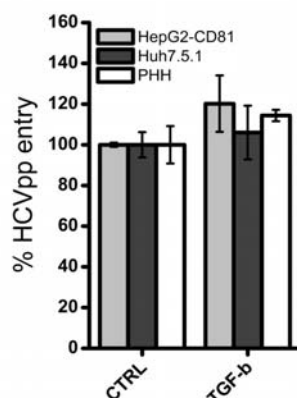
L'EGF et le TGF- $\alpha$  sont des ligands de l'EGFR bien caractérisés, dont la liaison favorise la dimérisation du récepteur et la phosphorylation subséquente de sa kinase intracytoplasmique (Schlessinger, 2002). Après avoir confirmé l'activité biologique de ces ligands dans nos cellules cibles, j'ai étudié le rôle de l'EGF et du TGF- $\alpha$  sur l'entrée du HCV. La liaison de l'EGF ou du TGF- $\alpha$  à l'EGFR améliore l'entrée des HCVpp dans des cellules Huh7.5.1, des cellules HepG2-

CD81 polarisées et des PHH, qui ont été préalablement privées de sérum (Figure 13). De plus, l'effet observé est dépendant de la dose et l'entrée du HCV peut être augmentée de 4 fois suite à l'incubation de cellules avec un ligand de l'EGFR. L'activation de l'EGFR par son ligand peut donc améliorer l'entrée du HCV. De plus, la plus grande affinité de l'EGF pour l'EGFR sur les hépatocytes (Thoresen et al., 1998) peut expliquer les différences observées entre l'EGF et le TGF- $\alpha$  dans l'augmentation de l'entrée des HCVpp.



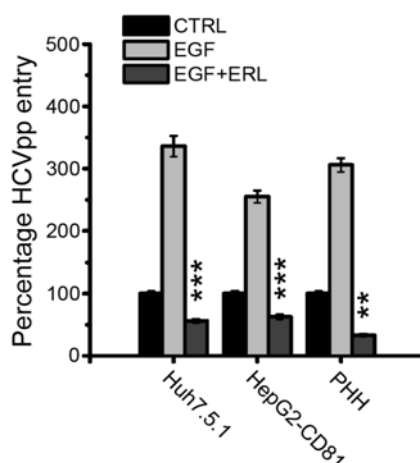
**Figure 13: Modulation de l'entrée du HCV par des ligands de l'EGFR.** Des cellules Huh7.5.1, HepG2-CD81 polarisées et PHH ont été mises en culture, puis privées de sérum. Le lendemain, les cellules ont été pré-incubées 1h avec de l'EGF ou du TGF- $\alpha$  à la concentration indiquée, puis infectées avec des HCVpp (HCV-J, 1b) en présence des ligands. Le pourcentage d'entrée des HCVpp dans les cellules Huh7.5.1, HepG2-CD81 polarisées et PHH comparé aux cellules contrôle sans ligand est représenté.

Par ailleurs, le TGF- $\beta$ , qui ne peut pas se lier à l'EGFR, n'a eu aucun effet sur l'entrée du HCV même à forte dose (1  $\mu\text{g/ml}$ ) (Figure 14). Ces données suggèrent que l'interaction directe de l'EGF ou du TGF- $\alpha$  avec le domaine de liaison du ligand de l'EGFR module l'entrée du HCV de manière spécifique.



**Figure 14: Modulation de l'entrée du HCV par un ligand contrôle, le TGF- $\beta$ .** Des cellules Huh7.5.1, HepG2-CD81 polarisées et PHH ont été mises en culture, puis privées de sérum. Le lendemain, les cellules ont été pré-incubées 1h avec du TGF- $\beta$  à la concentration de 1  $\mu$ g/ml, puis infectées avec des HCVpp (HCV-J, 1b) en présence du ligand. Le pourcentage d'entrée des HCVpp dans les cellules Huh7.5.1, HepG2-CD81 polarisées et PHH comparé aux cellules contrôle sans ligand est représenté.

Afin de confirmer le rôle du domaine de liaison du ligand de l'EGFR, un test de compétition entre l'EGF et l'inhibiteur de l'EGFR erlotinib a été utilisé. L'incubation de cellules Huh7.5.1, HepG2-CD81 polarisées et de PHH privées de sérum avec de l'EGF à forte dose (1  $\mu$ g/ml) en présence d'erlotinib (10  $\mu$ M) inverse l'augmentation de l'entrée des HCVpp due à l'EGF (Figure 15). Ces données confirment que l'erlotinib inhibe l'entrée du HCV en modulant l'activité de l'EGFR.



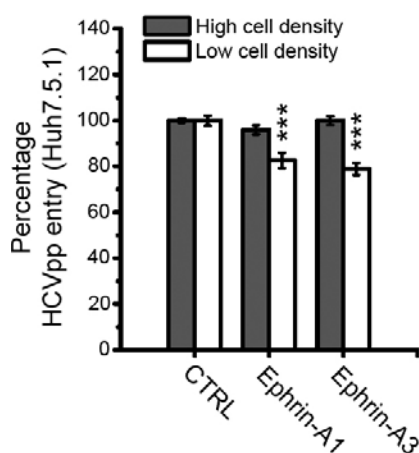
**Figure 15: Modulation de l'entrée du HCV par des ligands de l'EGFR et un inhibiteur.** Des cellules Huh7.5.1, HepG2-CD81 polarisées et PHH ont été mises en culture, puis privées de sérum. Le lendemain, les cellules ont été pré-incubées 1h avec de l'erlotinib à la concentration de 10  $\mu$ M ou du DMSO contrôle (0.7%). Puis, les cellules ont été infectées avec des HCVpp (HCV-J, 1b) en présence d'EGF à la concentration de 1  $\mu$ g/ml en combinaison ou non avec de l'erlotinib. Le pourcentage d'entrée des HCVpp dans les cellules Huh7.5.1, HepG2-CD81 polarisées et PHH comparé aux cellules contrôle est représenté. \*\* p<0,005; \*\*\* p<0,0005.

En conclusion, l'activation de l'EGFR par liaison de ses ligands est importante pour permettre une entrée accrue du HCV dans les cellules cibles.

## b) Les ligands de l'EphA2 diminuent l'entrée du HCV

Comme le récepteur EphA2 est constitutivement actif et que sa dégradation est modulée par des ligands cellulaires membranaires au cours de contacts de cellule à cellule (Himanen et al., 2010), l'étude de l'activation d'EphA2 induite par un ligand dans un modèle *in vitro* de culture cellulaire est techniquement plus complexe. Pour étudier le rôle de l'EphA2 et de son ligand dans l'entrée du HCV, nous avons utilisé des ligands solubles éphrine-A1 et -A3 qui peuvent imiter certains mécanismes de contact cellulaire (Walker-Daniels et al., 2002).

L'incubation de l'éphrine-A1 ou -A3 (1 µg/ml) avec des cellules Huh7.5.1, mais pas du ligand contrôle, entraîne une petite diminution de l'ordre de 20 % mais hautement reproductible et significative ( $p < 0,0005$ ), de l'entrée du HCV. De plus, cette diminution est dépendante de la densité de la cellule cible (Figure 16).



**Figure 16: Des ligands spécifiques d'EphA2 modulent l'entrée du HCV.** Des cellules Huh7.5.1 ont été mises en culture à forte et à faible densité ( $10^4$  cellules/puits de plaque 96 ou 24 puits, respectivement). Le lendemain, les cellules Huh7.5.1 ont été traitées avec 1 µg/mL d'éphrine-A1 ou -A3 solubles avec un tag Fc ou du contrôle correspondant (Fc-tag (Miura et al., 2009)). Puis, les cellules ont été infectées avec des HCVpp (HCV-J, 1b) en présence des ligands. Le pourcentage d'entrée des HCVpp dans les cellules Huh7.5.1 comparé aux cellules contrôle est représenté. \*\*\*  $p < 0,0005$ .

Ces résultats suggèrent que la liaison de ligands spécifiques d'EphA2 entraînant sa dégradation et donc son retrait de la membrane plasmique peut inhiber l'entrée du HCV et confirme donc un rôle d'EphA2 dans le processus d'entrée du HCV.

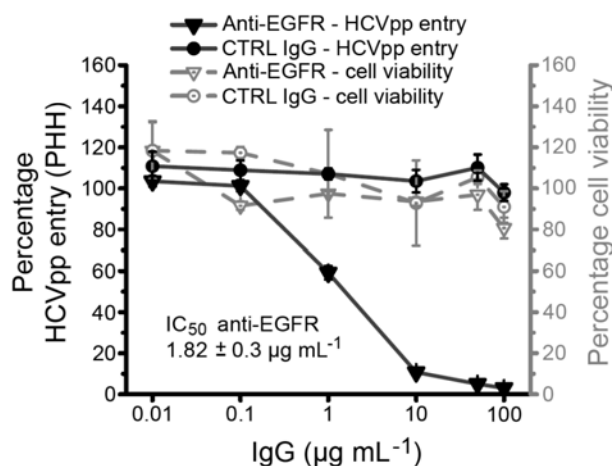
Des ligands spécifiques d'EGFR ou d'EphA2 modulent donc l'entrée du HCV, ce qui suggère une pertinence fonctionnelle du domaine de liaison du ligand de ces RTK pour l'entrée du HCV.

### 3. Des anticorps dirigés contre les RTK modulent l'entrée du HCV

Par criblage d'un large panel d'anticorps monoclonaux et de sérums, j'ai identifié un anticorps monoclonal anti-EGFR et un sérum anti-EphA2 qui se lient aux PHH et aux cellules d'hépatocarcinome humain (HepG2-CD81 et Huh7.5.1).

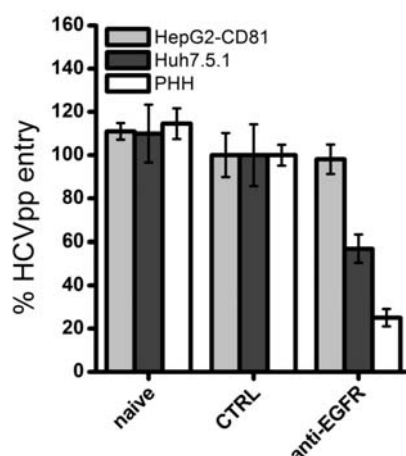
#### a) Un anticorps monoclonal anti-EGFR inhibe l'entrée du HCV

Nous avons examiné un large panel d'anticorps spécifiques de l'EGFR et j'ai identifié un anticorps monoclonal humain anti-EGFR qui inhibe l'entrée du HCV dans les PHH d'une manière dépendante de la dose, sans affecter la viabilité cellulaire (Figure 17).



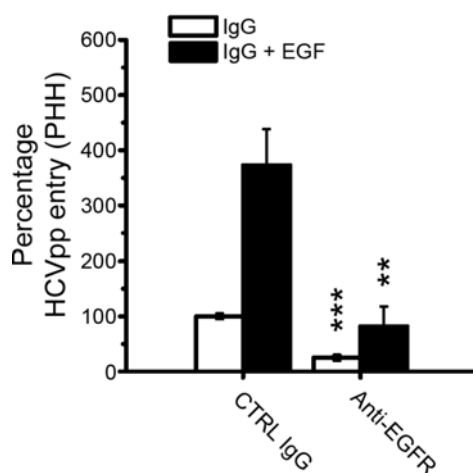
**Figure 17: Modulation de l'entrée du HCV par des anticorps spécifiques de l'EGFR.** Des PHH ont été mises en culture. Le lendemain, les cellules ont été pré-incubées 1h avec l'anticorps monoclonal anti-EGFR ou un mAb contrôle, à des concentrations croissantes. Puis, les cellules ont été infectées avec des HCVpp (HCV-J, 1b) en présence de mAb. La viabilité des cellules a été évaluée par un test MTT. Le pourcentage d'entrée des HCVpp dans les PHH comparé aux cellules contrôle est représenté sur l'axe de gauche et la viabilité cellulaire correspondante sur l'axe de droite. L'IC<sub>50</sub> est exprimée en médiane ± erreur standard de la moyenne de trois expériences indépendantes, en trois exemplaires.

L'effet de ce mAb anti-EGFR a ensuite été testé en parallèle sur l'entrée de HCVpp en cellules Huh7.5.1, HepG2-CD81 polarisées et PHH. Pour cela, les cellules ont été incubées avec le mAb anti-EGFR (10 µg/ml) pendant 1 h avant une infection par des HCVpp en présence de l'anticorps. De manière intéressante, l'inhibition de l'entrée du HCV est très prononcée en PHH (80%), moyenne en Huh7.5.1 (50%) et inexistante en HepG2-CD81 polarisées (Figure 18).



**Figure 18: Modulation de l'entrée du HCV par le mAb spécifique de l'EGFR.** Des cellules Huh7.5.1, HepG2-CD81 polarisées et PHH ont été mises en culture. Le lendemain, les cellules ont été pré-incubées 1h avec le mAb anti-EGFR ou un mAb contrôle à la concentration de 10 µg/ml, puis les cellules ont été infectées avec des HCVpp (HCV-J, 1b) en présence de mAb. Le pourcentage d'entrée des HCVpp dans les cellules Huh7.5.1, HepG2-CD81 polarisées et PHH comparé aux cellules contrôle est représenté.

Comme l'effet de l'anticorps est le plus prononcé en PHH, j'ai étudié le potentiel de ce mAb à entrer en compétition avec de l'EGF lors de l'entrée du HCV. L'anticorps anti-EGFR inverse l'augmentation de l'entrée du HCV induite par l'EGF. Ces résultats suggèrent que le domaine de liaison du ligand de l'EGFR est important pour l'entrée du HCV (Figure 19).



**Figure 19: Modulation de l'entrée du HCV par des anticorps spécifiques de l'EGFR.** Des PHH ont été mises en culture, puis privées de sérum. Le lendemain, les cellules ont été pré-incubées 1h avec le mAb anti-EGFR ou un mAb contrôle à la concentration de 10 µg/ml. Puis, les cellules ont été infectées avec des HCVpp (HCV-J, 1b) en présence d'EGF à la concentration de 1 µg/ml en combinaison ou non

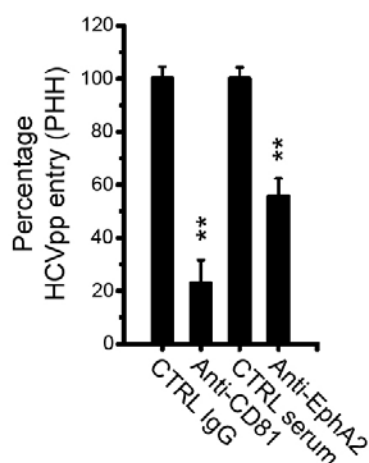


avec le mAb. Le pourcentage d'entrée des HCVpp dans les PHH comparé aux cellules contrôle est représenté. \*\* p <0,005; \*\*\* p <0,0005.

Ces résultats suggèrent que le domaine de liaison de l'anticorps ou que l'activation de l'EGFR est important pour une entrée efficace du HCV dans les cellules cibles.

b) Un sérum polyclonal anti-EphA2 diminue l'entrée du HCV

Pour étudier le rôle du domaine de liaison du ligand d'EphA2 dans l'entrée du HCV, nous avons produit par immunisation génétique des anticorps polyclonaux (pAb) dirigés contre la boucle extracellulaire d'EphA2. La pré-incubation de PHH avec ses pAb anti-EphA2 inhibe significativement (p<0,005) l'entrée du HCV (Figure 20), ce qui suggère que l'engagement du domaine extracellulaire d'EphA2 contribue à son effet sur l'entrée du HCV.



**Figure 20: Des anticorps spécifiques d'EphA2 modulent l'entrée du HCV.** Effet d'un sérum anti-EphA2 sur l'entrée des HCVpp dans des PHH. L'entrée des HCVpp en PHH a été testée en présence ou absence d'anticorps anti-CD81 (10 µg/mL) ou de sérum anti-EphA2 (dilution 1:50). \*\* p<0,005.

Des anticorps spécifiques d'EGFR et d'EphA2 modulent donc l'entrée du HCV, ce qui suggère une pertinence fonctionnelle du domaine extracellulaire, ainsi que de l'activité kinase de l'EGFR et d'EphA2 pour l'entrée du HCV.

II. **Partie 2: La transduction du signal par HRas joue un rôle dans l'entrée du HCV dans la cellule, en déclenchant l'assemblage du complexe de récepteur tétraspanine de l'hôte**

**Publication n°2:** HRas signal transduction mediates hepatitis C virus cell entry by triggering the assembly of the host tetraspanin receptor complex.

**Zona L§, Lupberger J§, Sidahmed-Adrar N#, Thumann C#, Harris H.J, Barnes A, Florentin J, Tawar R.G, Xiao F, Turek M, Durand S.C, Duong F.H.T, Heim M.H, Cosset F-L, Hirsch I, Samuel D, Brino L, Zeisel M.B, Le Naour F, McKeating J.A, Baumert T.F.** (§,# contribution équivalente)

*Cell Host Microb.* 2013, volume 13, Mar 13;13(3):302-13

L'entrée du HCV est la première étape de l'infection et nécessite l'interaction coopérative de plusieurs facteurs de la cellule hôte, y compris CD81 et CLDN1. Nous avons récemment identifié un rôle pour l'EGFR dans l'entrée du HCV par la régulation de la formation du complexe de co-récepteurs CD81-CLDN1, ce qui suggère que la signalisation de l'EGFR joue un rôle dans l'entrée du virus. Cependant, les mécanismes précis de régulation sont inconnus. Afin d'identifier les mécanismes moléculaires de signalisation de l'EGFR requis pour l'entrée du HCV, nous avons cherché à découvrir le lien moléculaire entre sa signalisation et la régulation de l'association des co-récepteurs.

Au cours de cette étude, nous avons identifié HRas comme un transducteur de signalisation clé de l'hôte pour l'entrée du HCV. En collaboration avec la plateforme TCA, nous avons réalisé un criblage à ARNi comprenant des molécules adaptatrices des voies de signalisation de l'EGFR. Ce criblage a démontré, en outre, que la réduction de l'expression de la GTPase HRas inhibe de façon marquée l'entrée du HCV. Par ailleurs, un mutant actif de HRas augmente l'entrée du HCV et permet de d'inverser l'inhibition de l'entrée du HCV par l'erlotinib, ce qui suggère que HRas est un interrupteur moléculaire qui régule l'entrée du HCV induite par l'EGFR.

Des études d'imagerie avancées, en collaboration avec le laboratoire de J.A. McKeating à Birmingham, Royaume Uni, ont révélé que la signalisation de HRas pouvait moduler la diffusion latérale et le trafic membranaire de CD81 par FRAP, mettant en évidence un rôle non constaté antérieurement pour HRas dans la mobilité de CD81. Une diffusion modifiée de CD81

permet l'assemblage du complexe de récepteurs tétraspanine - une étape essentielle dans l'entrée du HCV. Des analyses de FRET ont démontré que, comme pour l'EGFR, la réduction de l'expression de HRas réduit l'association membranaire de CD81 avec CLDN1.

L'analyse protéomique, en association avec le laboratoire de F. Le Naour à Villejuif, a révélé que HRas s'associe avec des TEM contenant les récepteurs de l'hôte CD81 et CLDN1 et des facteurs d'entrée du HCV inconnus jusque là: l'intégrine beta1 et Rap2B.

Des études fonctionnelles ont montré que HRas est important pour l'entrée d'autres virus, comme par exemple la grippe. Nos données montrent que les virus profitent de la signalisation de HRas pour entrer dans la cellule, car HRas permet le cloisonnement des facteurs d'entrée et le trafic de récepteurs membranaires. Nos données ont aussi identifié un nouveau mécanisme pour réguler l'invasion du foie par des pathogènes, dépendante de CD81.

Dans l'ensemble, nos résultats appuient un modèle où HRas et CD81 fournissent un lien fonctionnel entre la voie EGFR/HRas et l'association CD81-CLDN1 qui sont des conditions préalables à l'entrée du HCV et indiquent un rôle crucial de la signalisation de l'EGFR et de HRas pour le trafic de CD81. Ces données amélioreront notre compréhension des mécanismes moléculaires lors de l'entrée du HCV induite par l'EGFR et ouvrent de nouvelles perspectives pour le développement d'antiviraux ciblant les voies de signalisation.

# HRas Signal Transduction Promotes Hepatitis C Virus Cell Entry by Triggering Assembly of the Host Tetraspanin Receptor Complex

Laetitia Zona,<sup>1,2,12</sup> Joachim Lupberger,<sup>1,2,12</sup> Nazha Sidahmed-Adrar,<sup>3,4,13</sup> Christine Thumann,<sup>1,2,13</sup> Helen J. Harris,<sup>5</sup> Amy Barnes,<sup>5</sup> Jonathan Florentin,<sup>6</sup> Rajiv G. Tawar,<sup>1,2</sup> Fei Xiao,<sup>1,2</sup> Marine Turek,<sup>1,2</sup> Sarah C. Durand,<sup>1,2</sup> François H.T. Duong,<sup>1,2,7</sup> Markus H. Heim,<sup>7</sup> François-Loïc Cosset,<sup>8</sup> Ivan Hirsch,<sup>6</sup> Didier Samuel,<sup>3,4</sup> Laurent Brino,<sup>9</sup> Mirjam B. Zeisel,<sup>1,2</sup> François Le Naour,<sup>3,4</sup> Jane A. McKeating,<sup>5</sup> and Thomas F. Baumert<sup>1,2,10,11,\*</sup>

<sup>1</sup>Inserm, U1110, Institut de Virologie, 67000 Strasbourg, France

<sup>2</sup>Université de Strasbourg, 67000 Strasbourg, France

<sup>3</sup>Inserm, U785, 94807 Villejuif, France

<sup>4</sup>Université Paris-Sud, UMRS785, 94807 Villejuif, France

<sup>5</sup>School of Immunity and Infection, NIHR Liver Biomedical Research Unit, University of Birmingham, Birmingham B15 2TT, UK

<sup>6</sup>Inserm, U1068, CNRS UMR7258, Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, Institut Paoli-Calmettes, Aix-Marseille Université, 13273 Marseille, France

<sup>7</sup>Department of Biomedicine, Hepatology Laboratory, University of Basel, 4031 Basel, Switzerland

<sup>8</sup>Inserm, U758, Ecole Normale Supérieure, 69007 Lyon, France

<sup>9</sup>High Throughput Screening Platform, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Inserm, U964, CNRS UMR1704, Université de Strasbourg, 67404 Illkirch, France

<sup>10</sup>Pôle Hépato-Digestif, Nouvel Hôpital Civil, 67000 Strasbourg, France

<sup>11</sup>Institut Hospitalo-Universitaire, 67000 Strasbourg, France

<sup>12</sup>These authors contributed equally to this work

<sup>13</sup>These authors contributed equally to this work

\*Correspondence:

[thomas.baumert@unistra.fr](mailto:thomas.baumert@unistra.fr)

[http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2013.](http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2013.02.006)

02.006

SUMMARY

Hepatitis C virus (HCV) entry is dependent on coreceptor complex formation between the tetraspanin superfamily member CD81 and the tight junction protein claudin-1 (CLDN1) on the host cell membrane. The receptor tyrosine kinase EGFR acts as a cofactor for HCV entry by promoting CD81-CLDN1 complex formation via unknown mechanisms. We identify the GTPase HRas, activated downstream of EGFR signaling, as a key host signal transducer for EGFR-mediated HCV entry. Proteomic analysis revealed that HRas associates with tetraspanin CD81, CLDN1, and the previously unrecognized HCV entry cofactors integrin  $\beta 1$  and Ras-related protein Rap2B in hepatocyte membranes. HRas signaling is required for lateral membrane diffusion of CD81, which enables tetraspanin receptor complex assembly. HRas was also found to be relevant for entry of other viruses, including influenza. Our data demonstrate that viruses exploit HRas signaling for cellular entry by compartmentalization of entry factors and receptor trafficking.

INTRODUCTION

Viral entry into target cells requires the coordinated interaction of viral and host factors. Cellular kinases play a role in virus

uptake (Chakraborty et al., 2012; Mercer and Helenius, 2008; Pelkmans et al., 2005), but the underlying molecular mechanisms and signaling pathways are only poorly understood.

Hepatitis C virus (HCV) is a major cause of liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC) (El-Serag, 2012). Major challenges include the absence of a preventive vaccine and resistance to antiviral treatment in a large fraction of patients (Zeisel et al., 2011). HCV is an enveloped, positive-sense single-stranded RNA virus of the Flaviviridae family (Murray and Rice, 2011). Virus entry into hepatocytes is a multistep process that is regulated by receptor tyrosine kinases (RTKs) (Lupberger et al., 2011). Host cell factors for the initiation of infection include heparan sulfate (Barth et al., 2006), CD81 (Pileri et al., 1998), scavenger receptor type B class I (SR-BI) (Scarselli et al., 2002), claudin-1 (CLDN1) (Evans et al., 2007), occludin (OCLN) (Liu et al., 2009; Ploss et al., 2009), and Niemann-Pick C1-like 1 cholesterol absorption receptor (NPC1L1) (Sainz et al., 2012). Virus entry is a promising target for antiviral therapy since host cell receptors exhibit a high genetic barrier to viral resistance (Zeisel et al., 2011).

CD81 belongs to the tetraspanin superfamily of integral transmembrane proteins that have been implicated in a variety of physiological and pathological processes and play a role in pathogen infection (König et al., 2010; Kremontsov et al., 2010; Silvie et al., 2003). Tetraspanins are highly organized in microdomains displaying specific and direct interactions with other tetraspanins and molecular partners. Tetraspanins are implicated in membrane protein trafficking, partitioning, and clustering in tetraspanin-enriched microdomains (TEMs) that regulate signaling pathways by membrane compartmentalization (Berdichevski and Odintsova, 2007; Chambrion and Le Naour, 2010).

CD81 has a dynamic nature in HCV entry and its lateral diffusion regulates HCV infection (Harris et al., 2012). The physical interaction of CD81 with CLDN1 in a coreceptor complex is a prerequisite and essential step for HCV entry (Harris et al., 2010; Krieger et al., 2010). We demonstrated that RTKs, like epidermal growth factor receptor (EGFR), act as cofactors for HCV entry by promoting the formation of the CD81-CLDN1 coreceptor complexes, but the molecular mechanism is unknown (Lupberger et al., 2011). Unlike CD81, EGFR does not directly bind HCV E2, and, furthermore, EGFR activity directly correlates with HCV entry (Lupberger et al., 2011). Taken together, this highlights an essential role for RTK signaling in regulating the HCV entry process. Since EGFR supports the uptake of different viruses (Karlas et al., 2010; Lupberger et al., 2011; Pelkmans et al., 2005), it is likely that EGFR signaling plays a role in the entry of other virus families. To uncover the molecular mechanism underlying EGFR-regulated virus entry, we investigated the signaling pathway(s) and cellular transducers mediating HCV entry and investigated their impact on host receptor association and motility.

## RESULTS

### EGF Predominantly Activates Ras/MAPK Signaling in HCV Permissive Hepatic Cells

To identify the host signaling pathway of RTK-mediated HCV entry, we first studied EGFR signaling in Huh7.5.1 cells—a state-of-the-art permissive cell line for HCV infection, primary human hepatocytes (PHHs), and patient-derived liver biopsies. EGFR activation leads to phosphorylation of tyrosine residues in the intracellular domain that recruit signaling molecules to the plasma membrane that prime subsequent activation of events (Morandell et al., 2008), including mitogen-activated protein kinase (MAPK), phosphoinositide-3 kinase (PI3K), and v-Akt murine thymoma viral oncogene homolog (AKT) pathway activation (Figure 1A). Analysis of signal transduction in Huh7.5.1 cells, PHHs, and liver tissue (liver biopsies 987 and 990) with phosphokinase (Figures 1B and 1C and Figure S1A available online) and phospho-RTK arrays (Figures 1C and S1B) demonstrates that EGFR and the Ras/MAPK pathway are predominantly activated after EGF stimulation in human hepatocytes in vitro and in vivo. In contrast, activation of signaling pathways described in other cell lines and tissues (PI3K/AKT, PLC/PKC, p38/JNK, STAT3/5, Cbl, c-Src/ABL, and FAK) was less relevant in the liver-derived cells, PHHs, or liver tissue (Figures 1B, 1C, and S1) as shown by phosphorylation arrays. To further corroborate the relevance of the Ras/MAPK pathway as the primary signal transducer of EGFR in the liver, we measured the phosphorylation status of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 (ERK1/ERK2) and AKT by dynamic phosphoflow assay following EGFR stimulation (Firaguay and Nunès, 2009) (Figures S1C–S1F) in Huh7.5.1 and PHHs. EGF stimulation of Huh7.5.1 cells and PHHs activates Ras/MAPK signaling, while even prolonged incubation of the cells with EGF failed to activate the PI3K/AKT pathway (Figures S1D–S1F). Similar results were obtained by immunoblot of phosphoproteins in EGF-stimulated Huh7.5.1 or PHH lysates (Figure S1G) and lysates from patient-derived liver tissue (liver biopsies 956, 965, and 968) that had been stimulated with EGF ex vivo (Figure 1D). We noted

that EGF activated ERK1/ERK2 at significantly lower doses in Huh7.5.1 cells and PHHs (Figure S1G). In summary, these results demonstrate that EGF predominantly activates the Ras/MAPK pathway in hepatoma cells, PHHs, and liver tissue supporting the key relevance of the Ras/MAPK pathway for EGFR-mediated signaling in the liver.

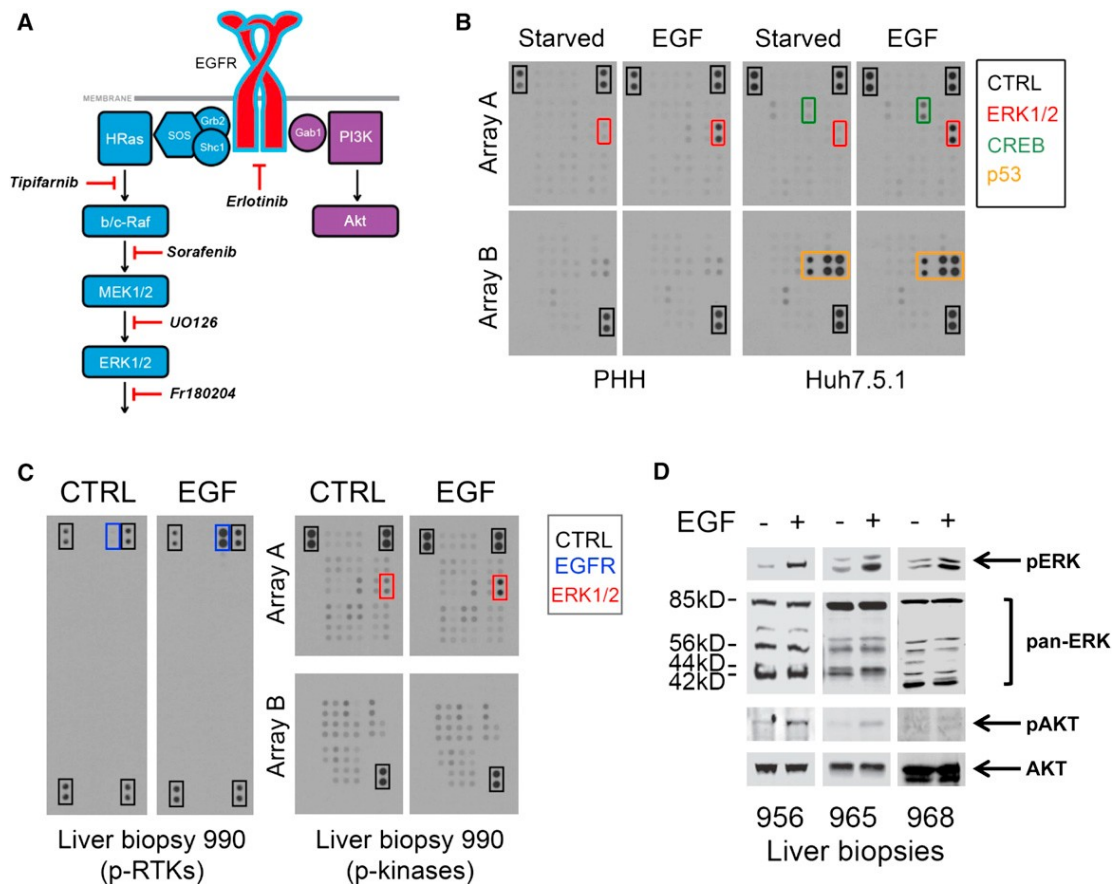
### EGFR Scaffolding Proteins Grb2 and Shc1 Are Relevant for HCV Entry

To identify EGFR-mediated signals important for HCV entry, we performed an unbiased small interfering RNA (siRNA) screen targeting the expression of known EGFR adaptors and associated proteins (Table S1). Among the identified EGFR scaffolding proteins with impact on HCV entry, we identified growth factor receptor-bound protein 2 (Grb2) and Src homology 2 domain-containing transforming protein 1 (Shc1): known activators of Ras GTPases and MAPK pathway (Kolch, 2005) (Figure 1A). Although STAT5b scored as a binding partner with potential functional relevance (Table S1), we observed no evidence for activation of the STAT5 signaling in EGF-treated PHHs or liver tissue (Figures 1 and S1A), and a STAT5b inhibitor had no effect on HCV entry as described below. Thus, we focused on the functional relevance of Grb2 and Shc1 for HCV entry. Silencing of Grb2 or Shc1 expression significantly ( $p < 0.01$ ) decreased HCV pseudoparticle (HCVpp) entry (Figure 2A) and cell-culture-derived HCV (HCVcc) infection (Figure 2B) to similar levels as EGFR silencing, while silencing Grb2-associated binding protein 1 (Gab1) that recruits PI3K (Figure 1A) had no effect on HCV infection (Figures 2A and 2B). Specific Grb2, Shc1, and Gab1 gene silencing was validated by immunoblot (Figure 2C). In contrast, silencing of Grb2 or Shc1 expression had no effect on the entry of murine leukemia virus (MLV) pseudoparticles (Figure 2D), suggesting that the observed inhibitory effect is not related to the pseudoparticle system. Finally, we confirmed the functional relevance of Grb2 and Shc1 in HCVpp infection of polarized HepG2-CD81 cells (Figure 2E). HepG2 cells polarize in vitro and develop bile-canalicular-like spaces between adjacent cells, thus allowing the study of virus entry in a model system closely related to polarized hepatocytes in the infected liver in vivo (Mee et al., 2009). Taken together, these data show a role for EGFR scaffolding proteins Grb2 and Shc1 in HCV entry and infection.

### Inhibition of Ras and Upstream MAPK BRaf Decreases HCV Entry

Since silencing of EGFR scaffolding proteins Grb2 and Shc1 inhibits HCV entry and these proteins activate Ras/MAPK signaling, we investigated whether other members of the MAPK pathway play a role in HCV entry. We thus used a panel of well-characterized small-molecule inhibitors (Figure 1A) of EGFR (erlotinib), rat sarcoma (Ras) (tipifarnib), Raf (sorafenib), BRaf (inhibitor VI), Raf-1 (inhibitor I), mitogen-activated protein kinase 1 and 2 (MEK1/MEK2) (U0126), and ERK1/ERK2 (Fr180204) and studied their effect(s) on HCV entry and infection (Figures 3A–3F). We also ruled out a role of other major EGFR signaling pathways including PI3K/AKT, PLC/PKC, p38/JNK, STAT3/5, and FAK using well-described small-molecule inhibitors (Figure 3G). The biological activity of all used inhibitors was confirmed in functional assays in Huh7.5.1 (Figure S2).





**Figure 1. EGFR Signaling Pathways in Human HCV-Permissive Liver Cells, Hepatocytes, and Patient-Derived Liver Tissue**

(A) Scheme of the two main canonical EGFR signaling cascades: the MAPK and the PI3K/AKT pathways. Inhibitors targeting members of these pathways are indicated.

(B and C) EGFR-transduced signals in human hepatocytes and liver tissue. (B) Detection of kinase phosphorylation in Huh7.5.1 and PHHs after EGF treatment (1 mg/ml; 15 min) with a human phosphokinase array detecting specific phosphorylation of 46 phosphorylation sites on 32 cellular kinases, which are indicated in Figure S1A. (C) Detection of RTK and kinase phosphorylation in liver tissue of patient biopsy 990 after EGF treatment (1 mg/ml; 15 min ex vivo) with a human phospho-RTK array (detecting specific phosphorylation of 42 different RTKs as indicated in Figure S1B) and a human phosphokinase array.

(D) Analysis of the phosphorylated and total forms of ERK1/ERK2 and AKT with specific antibodies in three different liver biopsies (956, 965, and 968) after 15 min EGF stimulation (1 mg/ml) ex vivo. Total protein (30 mg) was separated by SDS-PAGE and stained for total and phosphorylated forms of ERK and AKT by immunoblot.

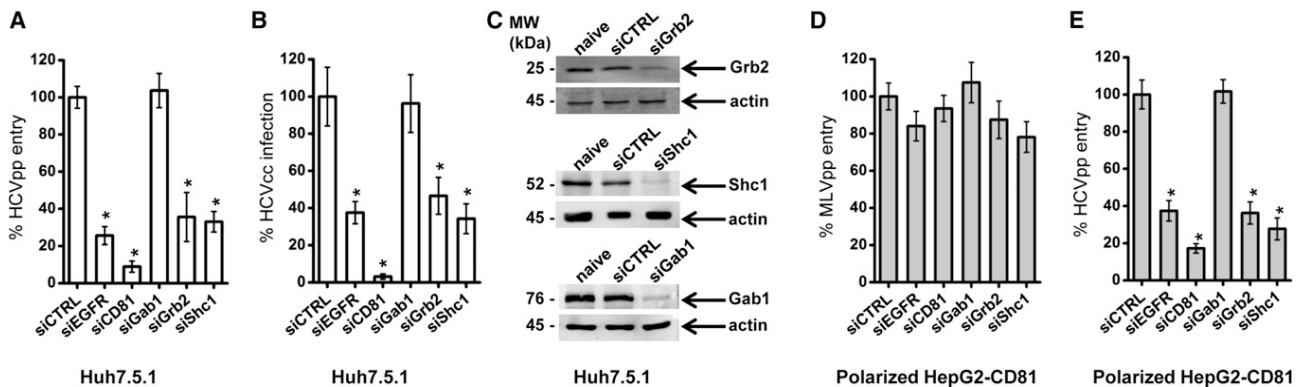
See also Figure S1 for more-detailed analyses of EGFR signaling.

All inhibitor concentrations were well tolerated in Huh7.5.1 and PHHs, as shown by MTT assays applied for inhibitors that inhibited HCV entry (Figures 3A and 3B). Since erlotinib and tipifarnib resulted in a robust, donor-independent, and highly significant ( $p < 0.0001$ ) inhibition of HCVpp entry in hepatoma cells and PHHs, we conclude that Ras is a predominant signal transducer required for EGFR-mediated HCV entry. Inhibition of Ras and upstream MAPK Raf, and to some extent MEK1/MEK2, decreased HCVpp and HCVcc infection in Huh7.5.1 cells and PHHs (Figures 3C–3E). Moreover, a different inhibition profile of MLVpp infection of PHHs suggests that the effects are not related to the lentiviral system (Figure 3F). Taken together, our observations demonstrate that the closer the inhibitor's target is toward EGFR in the MAPK signaling cascade (Figure 1A), the more efficiently HCV entry is inhibited. These data suggest that only upstream members of the MAPK signaling

pathway, but not other canonical EGFR pathways, play a major functional role in HCV entry.

#### HRas Is a Transducer of EGFR-Mediated HCV Entry

The classical Ras family comprises three isoforms: Harvey (H)-, Kirsten (K)-, and neuroblastoma (N)-Ras (Boguski and McCormick, 1993). Since Grb2, Shc1 and Raf play a role in EGFR-mediated HCV entry (Figures 2 and 3), we investigated the functional role of the Ras GTPase family in HCV entry using RNA interference (RNAi). HRas, KRas, or NRas expression (Figure S3A) was silenced in Huh7.5.1 with two individual siRNAs per target (Figures 4A–4C). The messenger RNA (mRNA) or protein expression after silencing was studied for all Ras isoforms or HRas, respectively (Figures 4A and 4B). Silencing of HRas expression markedly and significantly ( $p < 0.0005$ ) decreased HCV entry into Huh7.5.1 cells to a comparable level as EGFR



**Figure 2. EGFR Adaptors Grb2 and Shc1 Are Relevant for HCV Entry**

Silencing of EGFR adaptors Grb2 and Shc1 inhibits HCV entry. Huh7.5.1 (A–C) and polarized HepG2-CD81 (D and E) cells were transfected with individual siRNA directed against Gab1, Grb2, or Shc1 and infected with HCVpp, MLVpp, or HCVcc. (A, C, and E) Silencing of protein expression was confirmed by immunoblot with specific antibodies targeting Gab1, Grb2, Shc1, or actin (C). HCVpp entry was assessed in Huh7.5.1 (A) and in polarized HepG2-CD81 (E) cells transfected with siRNA. siCTRL, CD81- and EGFR-specific siRNAs served as internal controls. Data are expressed as percentage HCVpp entry relative to siCTRL-transfected cells (means  $\pm$  SD from three independent experiments in triplicate,  $n = 9$ ). (B) HCVcc infection in Huh7.5.1 cells transfected with the same siRNAs. Data are expressed as percentage HCVcc infection relative to siCTRL-transfected cells (means  $\pm$  SD from three independent experiments in triplicate,  $n = 9$ ). (D) MLVpp entry in polarized HepG2-CD81 cells. Data are expressed as percentage MLVpp entry relative to siCTRL-transfected cells (means  $\pm$  SD from three independent experiments in triplicate,  $n = 9$ ). \* $p < 0.01$ . See also Table S1.

silencing (Figure 4C). In contrast, silencing KRas or NRas expression had no detectable effect on HCV entry (Figure 4C). Isoform specificity of HRas gene silencing was validated by qRT-PCR (Figure S3B). Moreover, HRas silencing reduced EGF-induced ERK1/ERK2 phosphorylation, supporting a role of HRas in EGF-induced MAPK activation in hepatocytes (Figure S3C). These results demonstrate a specific role for the GTPase HRas in the HCV entry process.

Since EGFR mediates entry of viruses other than HCV, we studied the role of HRas on the entry of lentiviral pseudoparticles expressing glycoproteins from avian fowl plague virus influenza A (H7N1), measles virus, MLV, endogenous feline virus RD114, and vesicular stomatitis virus (VSV) in Huh7.5.1 cells. Silencing HRas expression had a significant ( $p < 0.0005$ ) inhibitory effect on the entry of influenza and measles pseudoparticles (Figure 4D), suggesting that these viruses require similar signaling pathways to enter hepatoma cells as HCV. Although we previously demonstrated that EGFR silencing had no effect on measles virus entry (Lupberger et al., 2011), HRas silencing impacts measles virus entry, suggesting an EGFR-independent role of HRas in this process.

To confirm the HRas dependency of EGFR-mediated HCV entry, we performed inhibition/rescue experiments using the EGFR inhibitor erlotinib and the patient-derived transdominant active V12 mutant of HRas (Beauséjour et al., 2003). Huh7.5.1 or PHHs were transduced to express the HRas V12 mutant and 72 hr later evaluated for their HCVpp permissivity in the presence or absence of 10 mM erlotinib (Figures 4E and 4F). Exogenous HRas expression in Huh7.5.1 and PHHs was confirmed by HRas-specific immunoblot (Figure S3D). The HRas V12 mutant increased HCVpp infection of Huh7.5.1 and PHHs in the absence of erlotinib, demonstrating an involvement of HRas in HCV entry (Figures 4E and 4F). Moreover, HRas V12

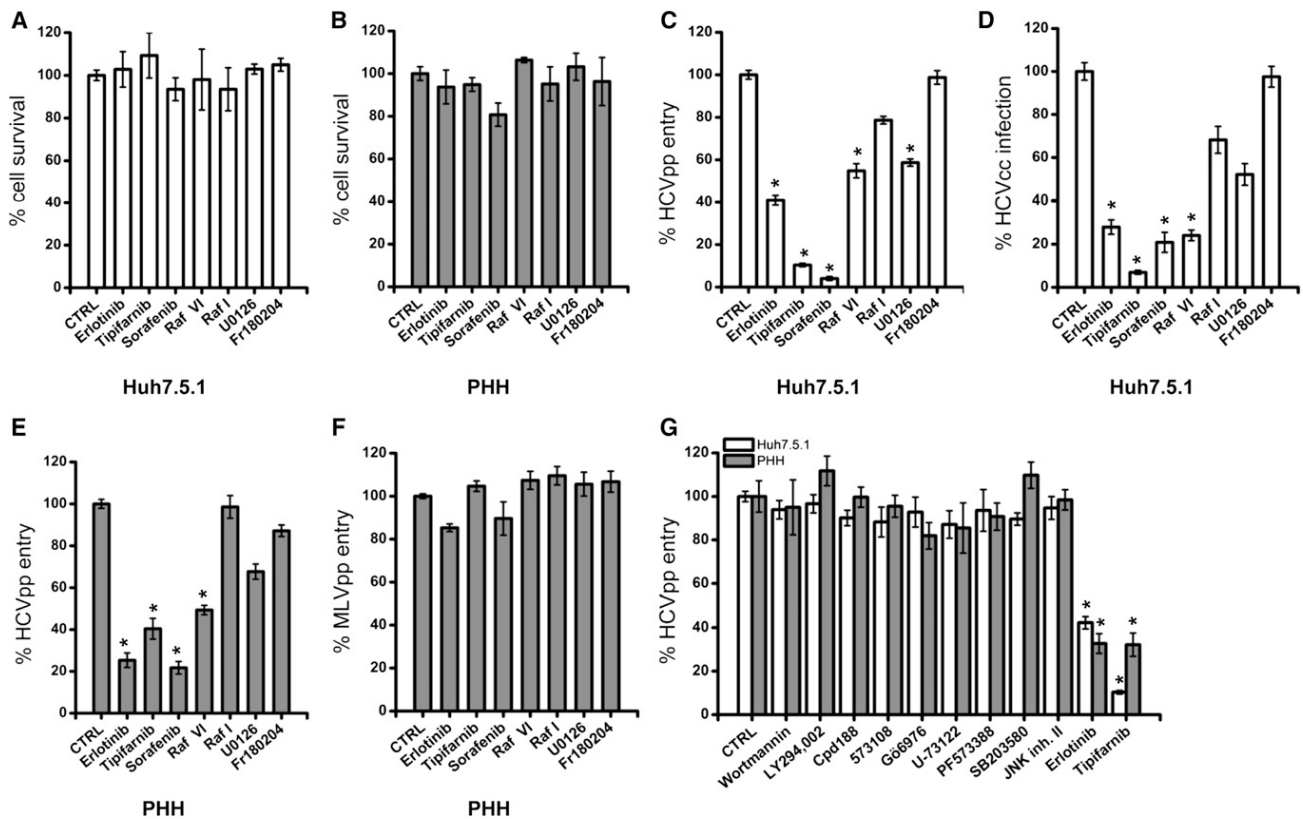
mutant rescued the inhibitory effect of erlotinib on HCV entry, confirming that HRas mediates EGFR-dependent HCV entry (Figures 4E and 4F).

Next, we investigated whether HRas mediates EGFR-dependent cell-cell transmission using a well-established cell-cell transmission assay (Lupberger et al., 2011). Reduction of (siHRas.6) or increase of (pHRas V12) HRas expression (Figures 4G and S3E–S3G) in target cells impaired significantly ( $p < 0.0005$ ) or enhanced cell-cell transmission compared to control-transduced cells, respectively. Furthermore, the HRas inhibitor tipifarnib blocked HCV cell-cell transmission (Figures 4G and S3G). These data highlight a previously unrecognized role of HRas during viral spread.

#### HRas Associates with HCV Cell Entry Factors CD81 and CLDN1

EGFR promotes the association of CD81-CLDN1 coreceptor complexes that are important for HCV entry (Lupberger et al., 2011). To investigate whether EGFR signaling modulates CD81-CLDN1 association, we analyzed whether TEMs contain members of the EGFR signaling pathways using proteomic analysis of CD81 immunoprecipitates. HepG2 and HepG2-CD81 cells were differentially labeled with stable isotope labeling with amino acids (SILAC) (Ong et al., 2002) and lysed with brij97 detergent that is reported to preserve tetraspanin interactions (Le Naour et al., 2006), and HepG2 and HepG2-CD81 lysates were pooled equally according to SILAC protocols (Ong et al., 2002). From this pool, CD81 was pulled down with beads coupled with CD81-specific IgG and coprecipitated protein complexes analyzed by mass spectrometry. Among the CD81 coprecipitated proteins were several integrins ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 6$ , and  $\beta 1$ ) that are well-characterized TEM components. Therefore, we defined the threshold of specificity  $>2$  accordingly to the





**Figure 3. Upstream MAPK Are Relevant for HCV Entry in Hepatoma Cells and Human Hepatocytes**

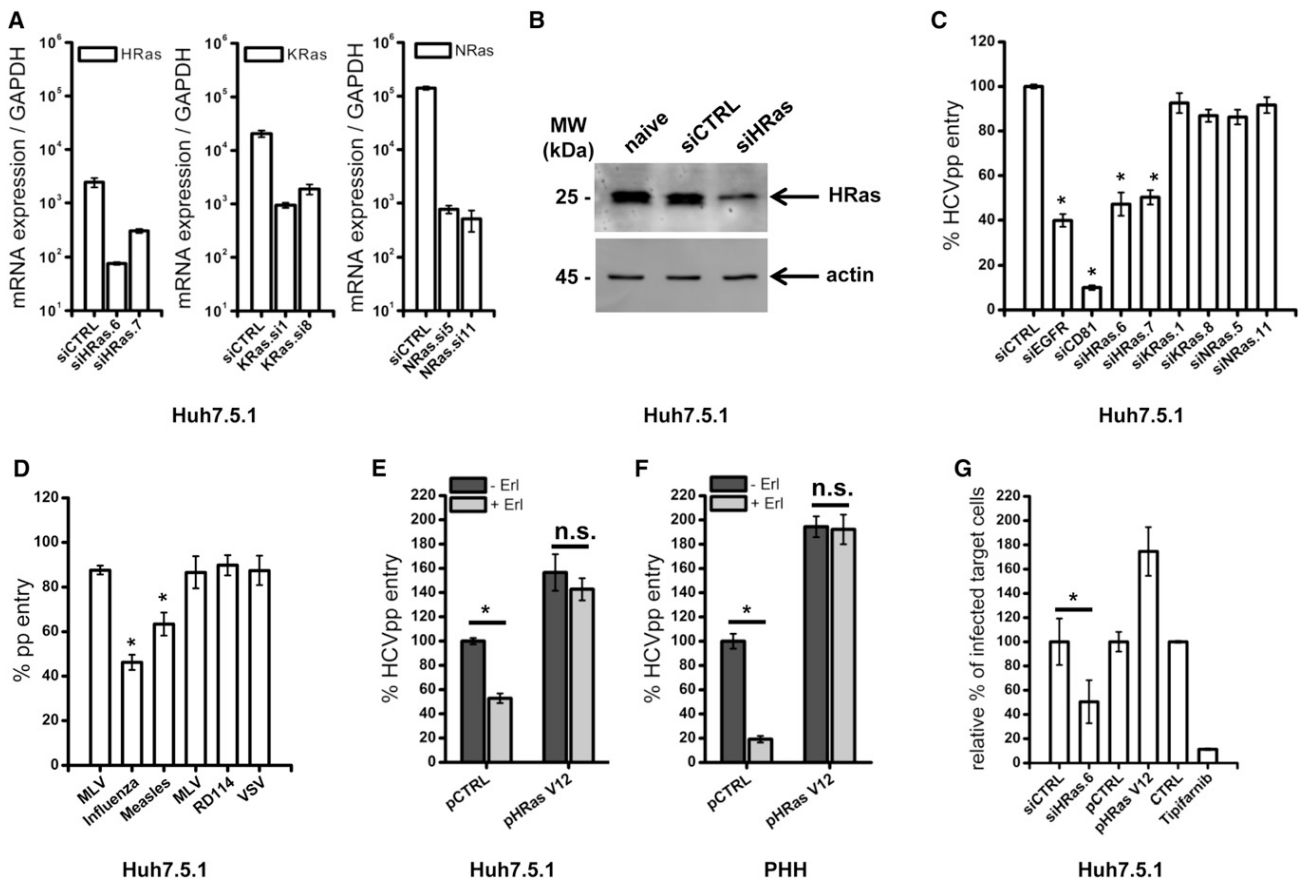
Cell survival (A and B), HCVpp entry (C, E, and G), HCVcc infection (D), or MLVpp entry (F) in Huh7.5.1 cells (A, C, D, and G) or PHHs (B, E, F, and G) incubated with small-molecule inhibitors (10 mM) targeting EGFR (erlotinib), Ras (tipifarnib), Raf (sorafenib, 10 mM for pseudoparticles and 1 mM for HCVcc), BRaf (Raf inhibitor VI), Raf-1 (Raf inhibitor I), MEK1/MEK2 (U0126), or ERK1/ERK2 (Fr180204) or the major EGFR pathways, including PI3K (wortmannin and LY294,002), STAT3 (Cpd188), STAT5 (573108), PKC (Gö6976), PLC (U-73122), FAK (PF573288), p38 (SB203580), JNK (JNK inhibitor II), and Ras (tipifarnib). One hour after incubation with inhibitors, HCVpp, MLVpp, or HCVcc was added to the cells in the presence of inhibitors. Cell viability was assessed by MTT assay. EGFR (erlotinib) serves as internal control. Data are expressed as percentage HCVpp or MLVpp entry and HCVcc infection relative to solvent CTRL-treated cells (means  $\pm$  SEM from four independent experiments in triplicate,  $n = 12$ ). \* $p < 0.0001$ . See also Figure S2.

isotope ratio  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  of coprecipitated integrins and accordingly to SILAC standard procedures (Ong et al., 2002). Above this threshold, we identified tetraspanin-associated proteins such as membrane protease ADAM10, several tetraspanins (CD9, CD81, CD151), and known specific interaction partners of CD81, such as EWI-2 and CD9P-1/EWIF, validating this differential proteomic approach to identify CD81-associated proteins. Interestingly, HCV entry factors CLDN1 and SR-BI but not OCLN or NPC1L1 were identified as CD81 TEM components corroborating a close cooperation of CD81, CLDN1, and SR-BI during HCV entry (Krieger et al., 2010). These results were confirmed in a second experiment using SILAC proteomics with inverted isotope labeling (Table 1). Among the 169 components identified in TEMs, we identified HRAs as the only member of the canonical EGFR signaling pathways associating with CD81. A physical interaction of HRAs with the tetraspanin coreceptor complex was further supported by a partial but robust colocalization of CD81 with HRAs at the plasma membrane of Huh7 cells (Figure S4A) as calculated according to Pearson ( $R_r = 0.25$ ) and Manders ( $R = 0.659$ ) coefficients and intensity correlation quotient (ICQ = 0.129) (Bolte and Cordelières, 2006;

Brown et al., 2010; Manders et al., 1992) (Figure S4). To further study the relevance and robustness of the HRAs-CD81 colocalization, we transduced cells to express the HRAs V12 mutant (Figure S4B). The colocalization of HRAs V12 with CD81 was calculated (Image J software) and significantly ( $p < 0.005$ ) increased as demonstrated by the Pearson ( $R_r = 0.544 \pm 0.047$ ) and Manders ( $R = 0.825 \pm 0.056$ ) coefficients and ICQ ( $0.387 \pm 0.067$ ) as compared to empty vector ( $R_r = 0.278 \pm 0.054$ ;  $R = 0.820 \pm 0.05$ ; ICQ =  $0.175 \pm 0.022$ ) (Figures S4C and S4D). The distribution of HRAs at the plasma membrane was observed as intense punctuated spots and correlated with high CD81 content. Taken together, these data suggest that active HRAs physically associates with CD81.

**Functional Network Analyses of CD81-Associated Proteins Identified Rap2B and Integrin Beta1 as Cofactors for HCV Entry**

To identify members of TEM containing CD81 and CLDN1 with a functional role in HCV entry, we analyzed the 169 identified CD81-associated proteins (Table 1 and data not shown) for known and predicted HRAs protein interactions using the



**Figure 4. HRas Is a Host Cell Factor for HCV Entry**

(A) mRNA expression of HRas, KRas and NRas compared to GAPDH after silencing of each Ras isoform with isoform-specific siRNAs. (B) Analysis of protein expression by immunoblot with specific antibodies targeting HRas or actin after Ras silencing (siHRas.6). (C) HCVpp entry in Huh7.5.1 cells transfected with individual siRNAs directed against HRas (si6 and si7), KRas (si1 and si8), and NRas (si5 and si11). siCTRL, CD81, and EGFR-specific siRNAs served as internal controls. Data are expressed as percentage HCVpp entry relative to siCTRL-transfected cells (means  $\pm$  SEM from four independent experiments in triplicate,  $n = 12$ ). (D) Cell entry of pseudoparticles expressing envelope glycoproteins of influenza, measles, MLV, RD114, and VSV in Huh7.5.1 cells transfected with an individual siRNA directed against HRas (si6). Two independent MLVpp preparations were used. siCTRL served as internal control. Data are expressed as percentage pseudoparticle entry relative to siCTRL-transfected cells (means  $\pm$  SEM from three independent experiments in triplicate,  $n = 9$ ). (E and F) Inhibition of HCV entry by erlotinib is rescued by a transdominant active HRas mutant. HCVpp entry in Huh7.5.1 cells (E) and in PHHs (F) transduced with lentiviruses expressing a transdominant active HRas mutant (pHRas V12) and treated with erlotinib (10 mM). For HRas protein expression, see Figures S3C and S3D. Data are expressed as percentage HCVpp entry relative to pCTRL cells (means  $\pm$  SEM from four independent experiments in triplicate,  $n = 12$ ). (G) Functional role of HRas in viral cell-cell transmission. Effect of HRas silencing by siHRas.6, overexpression of HRas V12, or HRas inhibition by tipifarnib (10 mM) on viral spread is shown. Data are expressed as percentage cell-cell transmission relative to respective controls (for RNAi, means  $\pm$  SD from three independent experiments in triplicate,  $n = 9$ ; for HRas V12 and tipifarnib, means  $\pm$  SD from one representative experiment in triplicate,  $n = 3$ ). SD for CTRL and tipifarnib are 0.77 and 0.68 respectively, and are thus not visible. \* $p < 0.0005$ . See also Figure S3.

STRING database (Jensen et al., 2009; Lupberger et al., 2011). STRING represents a metadatabase mapping all known protein-protein interactions onto a common set of genomes and proteins (Jensen et al., 2009). This analysis suggests a potential network of proteins connecting CD81 and HRas (Figure 5A) that includes known HCV entry factors CD81 and CLDN1 and HCV host factor apolipoprotein E (apoE). Functional analysis of members of this network using RNAi/HCVpp studies identified Ras-related protein (Rap2B) and integrin beta1 (ITGB1) as cofactors for HCV entry (Figure 5B). Silencing of ITGB1 and Rap2B expression was confirmed with individual siRNAs

(Figures 5C–5E). An ITGB1-specific antibody markedly and significantly ( $p < 0.0001$ ) inhibited HCV infection of Huh7.5.1 cells and PHHs (Figures 5F and 5G), validating the role of ITGB1 for HCV entry. These data suggest a functional network organized by tetraspanins in the plasma membrane consisting of CD81-CLDN1, HRas, Rap2B, and ITGB1.

**HRas Is Required for Lateral Diffusion of CD81 Promoting CD81-CLDN1 Associations**

Since CD81 plays a role in the lateral diffusion of HCV (Harris et al., 2012), we studied the effect(s) of EGFR/HRas signaling

**Table 1. Subset of CD81-Associated Proteins in HepG2-CD81 Cells Identified by SILAC Differential Proteomics, Including HRas Interacting Partners**

Protein name	ID	Sequence (%)	MW (kDa)	SILAC Labeling (Ratio H/L)	Inverted SILAC Labeling [Ratio 1 / (H/L)]
CD151	P48509	13.4	28.30	15.86	64.72
EWI-2	Q969P0	47	65.03	13.93	85.67
GNAI3	P08754	22.3	40.53	13.52	41.35
CD9	P21926	7.5	25.41	13.38	231.30
CD9P-1/ EWIF	Q9P2B2	36.70	98.55	13.16	6.72
CD81	A6NMH8	30.3	29.81	12.64	111.17
ADAM10	O14672	48.3	84.14	11.45	69.25
GNAI1	P63096	20.1	40.36	11.29	14.11
RAP2B	P61225	32.2	20.50	10.46	22.75
MPZ	Q14902	9.2	27.95	9.05	NaN
APOE	P02649	40.1	36.15	8.13	1.56
CLDN1	A5JSJ9	16.1	22.74	7.83	12.61
CD59	E9PR17	15.4	14.53	7.19	NaN
HRas	P01112	20.1	21.30	5.84	103.91
RALA	P11233	19.4	23.57	5.32	4.73
Integrin alpha6	P23229	28.8	126.63	5.09	15.78
SCAMP3	O14828	9.2	38.29	4.54	NaN
Integrin alpha1	P56199	12.4	130.85	2.98	17.16
Integrin beta1	P05556	27.7	88.41	2.61	6.51
SR-BI	Q59FM4	12.4	64.19	2.56	7.69
LMNA	P02545	19.6	74.14	2.53	0.51
SOD2	P04179	13.1	24.72	NaN	2.91
LGALS1	P09382	17.0	14.72	NaN	2.56

HepG2-CD81 and HepG2 cells were differentially labeled with stable carbon isotopes  $^{12}\text{C}$  or  $^{13}\text{C}$  (SILAC method). CD81-associated complexes were coprecipitated with CD81, digested, and analyzed by mass spectrometry. The protein ID, its molecular weight, the number of the identified peptides, and total sequence coverage for each identified protein is stated. Specificity threshold of CD81 association from each individual identified protein was defined as a peak volume ratio H/L >2 of the differentially isotope labeled versions of each protein. The results were validated by a second experiment with inverse isotope labeling (inverted). The specificity threshold for the inverted SILAC labeling was  $1 / (\text{H/L}) > 2$ . NaN, not a number. See also [Figure S4](#).

on CD81 dynamics by real-time fluorescence recovery after photobleaching (FRAP). Huh7.5.1 cells were transduced to express AcGFP-CD81, and the basal surface was imaged by TIRF microscopy. We observed a significant increase in CD81 diffusion coefficient (CTRL 0.09  $\text{mm}^2/\text{s}$ ; tipifarnib 0.18  $\text{mm}^2/\text{s}$ ,  $p < 0.05$ ) in Huh7.5.1 cells treated with the HRas inhibitor tipifarnib ([Figure 6A](#)). These data suggest that HRas signaling reduces CD81 mobility by promoting an interaction with other proteins. To investigate whether EGFR acts on CD81-CLDN1 interaction via the putative EGFR/Shc1/HRas/BRAF pathway, we studied

whether silencing of Shc1, HRas, or BRAF modulates CD81-CLDN1 coreceptor interaction using a well-established fluorescence resonance energy transfer (FRET)-based assay ([Harris et al., 2010](#)). Silencing of Shc1, HRas, or BRAF expression significantly ( $p < 0.05$ ) reduced CD81-CLDN1 FRET in Huh7.5.1 cells ([Figures 6B–6D](#), black bars) while silencing had a minimal effect on CD81-CD81 association ([Figures 6B–6D](#), open bars). These results demonstrate that HRas and BRAF play a role in the formation and/or maintenance of the CD81-CLDN1 coreceptor complexes. We previously reported that although EGFR stimulation increased HCV entry, this process does not require ligand-induced EGFR stimulation since the basal activity of the receptor, even after serum starvation, is sufficient to support HCV entry ([Lupberger et al., 2011](#)). Indeed, EGF had no significant effect on CD81-CLDN1 FRET (data not shown), supporting the hypothesis that the steady-state complex of CD81-CLDN1 is dependent on low-level constitutive EGFR signaling.

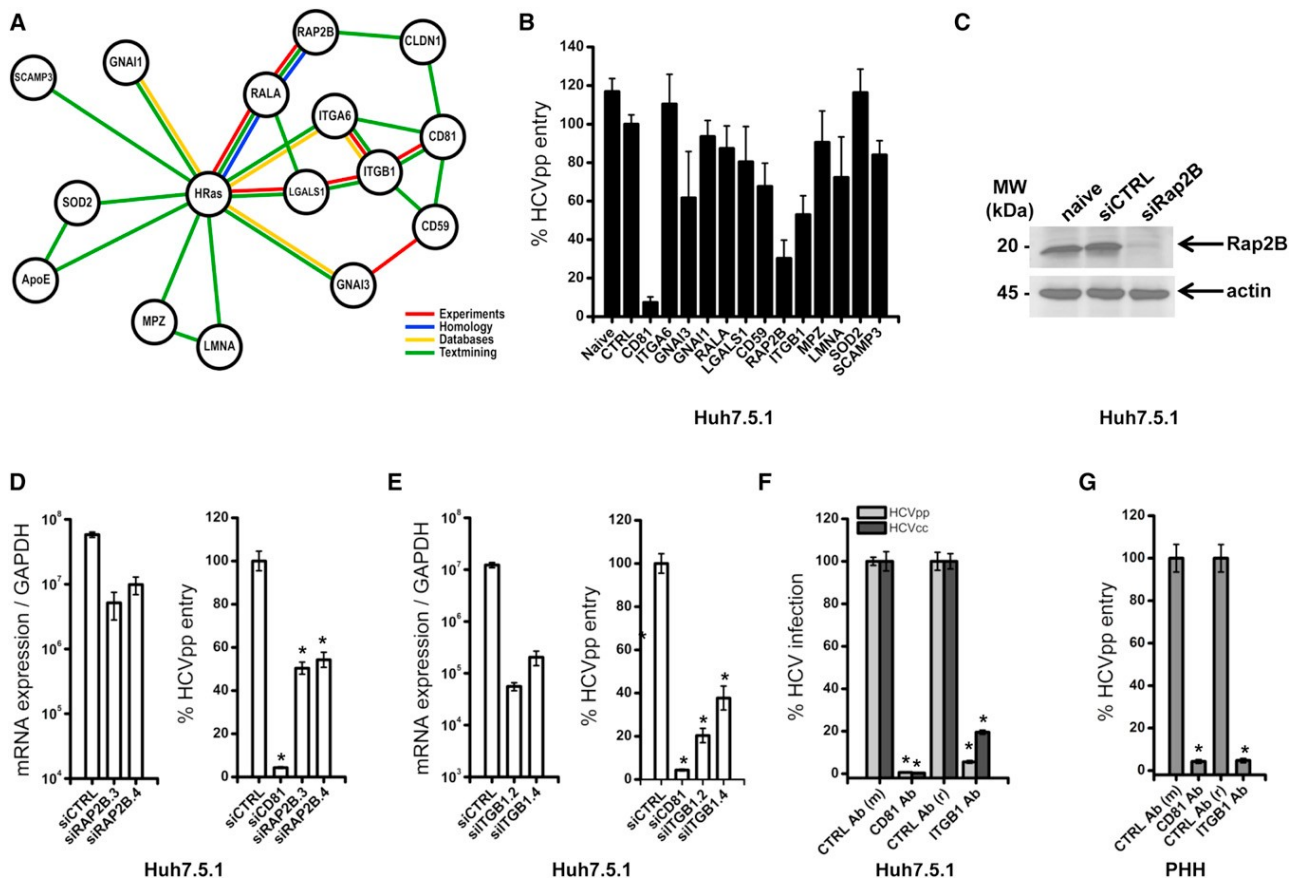
These data lead us to conclude that HCV exploits the EGFR/HRas pathway to compartmentalize host entry factors and receptor trafficking to regulate CD81-dependent pathogen invasion of the liver.

## DISCUSSION

Here, we identified GTPase HRas as key signaling factor in HCV entry. We discovered that HRas associates with CD81-CLDN1, providing a physical link between the EGFR/Shc1/Grb2/HRas signaling pathway and the HCV entry factor complex. Furthermore, we identified the CD81-associated proteins ITGB1 and Rap2B as cofactors for HCV entry. We demonstrate that the identified signaling pathway mediates CD81-CLDN1 coreceptor associations and that HRas signaling regulates CD81 diffusion and confinement in the plasma membrane. Since CD81 lateral diffusion and its association with CLDN1 are essential for HCV entry in vitro ([Harris et al., 2012](#); [Harris et al., 2010](#); [Krieger et al., 2010](#)), these findings identify HRas as a trigger of HCV entry.

HCV-CD81 engagement has been suggested to induce MAPK ([Brazzoli et al., 2008](#)) and PI3K/AKT ([Liu et al., 2012](#)) signaling. Moreover, EGFR function is required for HCV entry ([Lupberger et al., 2011](#)) and HCV-CD81 engagement promotes EGFR phosphorylation ([Diao et al., 2012](#)). These studies suggest that HCV may use multiple signaling pathways and mechanisms for entry; however, the underlying molecular mechanisms and the relevance of these pathways for HCV entry into human hepatocytes or liver tissue in vivo are unknown. Since transformed hepatoma cells such as Huh7 have deregulated signal transduction pathways, observations might be blurred or confounded by cell-line-specific effects. Here we combined RNAi screening, phosphorylation arrays, and small-molecule inhibitors to study signaling in HCV entry in primary liver cells, concluding a role for EGF priming HRas/MAPK signaling pathway in HCV infection of human hepatocytes and patient-derived liver tissue ([Figures 1 and S1](#)).

Interestingly, although in our hands silencing of PI3K regulatory subunit 1 (PI3KR1) expression reduced HCVpp entry (data not shown) as previously shown ([Liu et al., 2012](#)), we failed to validate its functional relevance for HCV entry using two different small-molecule PI3K inhibitors ([Figures 3G and S2A–S2C](#)).



**Figure 5. Functional Analysis of HRas-CD81-Associated Proteins Identifies Integrin Beta1 and Rap2B as Previously Undiscovered HCV Entry Factors**

(A) Subset of TEM protein association network of the 169 proteins associating with HRas and CD81 identified by STRING analysis (Jensen et al., 2009). Lines connecting proteins show direct (physical) and indirect (functional) associations derived from numerous sources, including experimental repositories (red lines), computational prediction methods (blue lines), databases (yellow lines), and public text collections (green lines).

(B) Functional analysis of protein association network via RNAi. HCVpp entry in Huh7.5.1 cells transfected with pooled siRNA directed against identified members of CD81-associated protein network containing HRas. siCTRL and CD81-specific siRNA served as internal controls. Data are expressed as percentage HCVpp entry relative to siCTRL-transfected cells (means ± SD from one representative experiment, n = 3).

(C) Analysis of protein expression in lysates of Huh7.5.1 with silenced Rap2B expression by immunoblot with specific antibodies targeting Rap2B or actin (Rap2B pool siRNA).

(D and E) mRNA expression of Rap2B (D) and integrin beta1 (ITGB1) (E) compared to GAPDH or HCVpp entry after silencing of each protein with individual siRNAs. Huh7.5.1 cells were silenced with siRAP2B.3 or siRAP2B.4 and siITGB1.2 or siITGB1.4 for 72 hr prior to mRNA expression measurement or to HCVpp infection of Huh7.5.1 cells. siCTRL and CD81-specific siRNA served as internal controls. Data are expressed as mRNA expression of Rap2B or ITGB1 compared to GAPDH (means ± SD from one representative experiment in triplicate, n = 3) or percentage HCVpp entry relative to siCTRL-transfected cells (means ± SEM from three independent experiments in triplicate, n = 9).

(F and G) Effect of a neutralizing ITGB1-specific antibody on HCV entry and infection. Huh7.5.1 cells (F) or PHHs (G) were treated with 25 mg/ml antibodies 1 hr prior and during infection with HCVpp or HCVcc. Irrelevant rabbit and mouse IgGs and a CD81-specific antibody were used as controls. Data are expressed as percentage HCVpp entry or HCVcc infection relative to cells treated with irrelevant IgG (means ± SEM from four experiments in triplicate, n = 12).

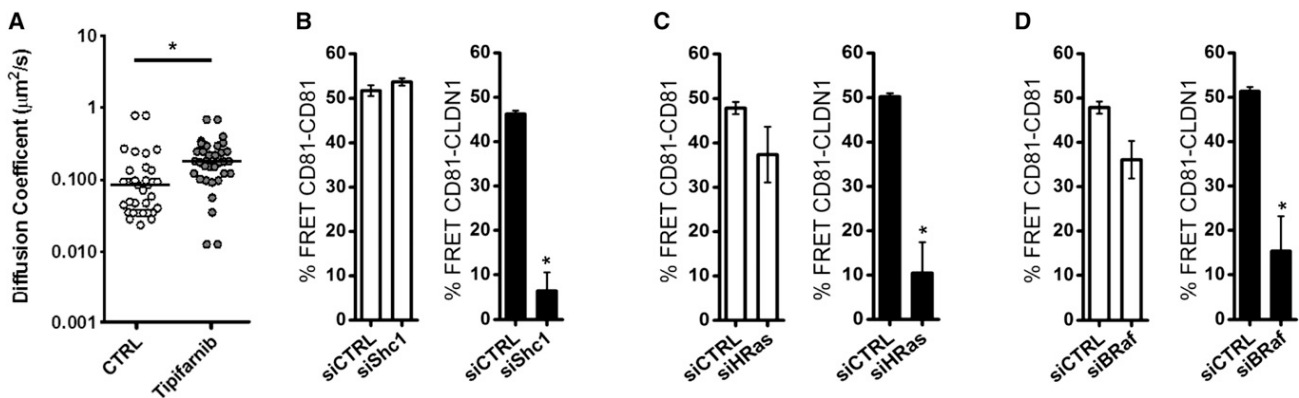
\*p < 0.0001.

Moreover, silencing of Gab1 that binds EGFR and activates PI3K had no significant impact on HCVpp entry (Figure 2), and EGFR signaling through AKT was limited or absent in PHHs or liver tissue in vivo (Figures 1 and S1). Thus, our data suggest that HRas and the upstream MAPK pathway are key signal transducers for EGFR-mediated HCV entry into PHHs and the human liver in vivo and that signal transduction through the PI3K/AKT pathway most likely plays only a minor role.

Our functional analyses suggest that HRas acts as a molecular switch promoting RTK-mediated HCV entry. Inhibition/rescue

experiments highlight that EGFR-mediated HCV entry is dependent on HRas function. Our observation that HRas associates with tetraspanin CD81 supports our biochemical data showing that HRas links RTK signaling to CD81 and promotes CD81-CLDN1 association. This is in line with the recent finding that CD81 internalization via a clathrin- and dynamin-dependent process is independent of the CD81 cytoplasmic domain, suggesting a role for associated partner proteins in regulating CD81 trafficking (Farquhar et al., 2012). Moreover, it has been reported that CD81 engagement activates Rho GTPase family





**Figure 6. HRas Is Required for Lateral Diffusion of CD81 Promoting CD81-CLDN1 Associations**

(A) AcGFP-CD81 diffusion coefficient in Huh7.5.1 cells after 4 hr treatment with DMSO or 10 mM tipifarnib. The median CD81 diffusion coefficient (DMSO, 0.09 mm<sup>2</sup>/s; tipifarnib, 0.18 mm<sup>2</sup>/s) is shown, with each point representing a bleached region of interest and the black line represents the median value.

(B–D) FRET of CD81-CD81 (open bars) and CD81-CLDN1 (black bars) coreceptor associations in Huh7.5.1 cells incubated with siRNA specific for Shc1 (B), HRas (C) or BRaf (D) (means ± SEM from ten independent experiments, n = 10).

\*p < 0.05.

members leading to actin-dependent relocation of HCV E2-CD81 and activation of Raf/MAPK signaling (Brazzoli et al., 2008). Membrane microdomains, such as TEMs or lipid rafts, play a role in a variety of physiological and pathological processes, for instance as signaling platform (Le Naour et al., 2006). TEMs and lipid rafts differ in their solubility in Triton X-100, as well as in their protein composition, and thus are distinct membrane microdomains (Le Naour et al., 2006). GDP-bound inactive HRas is associated to lipid rafts, whereas GTP-bound active HRas is segregated from lipid rafts to bulk plasma membrane microdomains where it activates signal transduction including the Raf/MAPK pathway (Tian et al., 2007). Thus, it is likely that EGFR-induced signals activate HRas function and that GTP-bound activated HRas leads to rearrangement of tetraspanins, resulting in formation of the essential CD81-CLDN1 entry receptor complex.

Our functional analysis of HRas-CD81-associated proteins demonstrates for the first time a functional role of the GTPase Rap2B and ITGB1 as cofactors for HCV entry. Like HRas, Rap GTPases are known regulators of integrin function. Rap increases integrin avidity by promoting integrin clustering (Kinbara et al., 2003) that may have an important impact on the CD81 TEM formation. ITGB1 is a major TEM component. Integrins are heterodimeric transmembrane proteins composed of an alpha and a beta subunit that couple the extracellular matrix to the F-actin cytoskeleton and signal in a bidirectional manner (Wickström and Fässler, 2011). Conformational changes of integrins elicit signaling events that promote cytoskeletal rearrangement and internalization of many viruses (Stewart and Nemerow, 2007). EGFR can be activated in an ITGB1-dependent manner, and ITGB1 controls EGFR signaling (Morello et al., 2011; Moro et al., 1998), suggesting a crosstalk between ITGB1 and EGFR in HCV entry. Collectively, these findings suggest that HRas acts together with Rap2B and ITGB1 to form a functional complex that may regulate host cell entry receptor mobility, as well as plasma membrane and cytoskeleton organization.

Indeed, the HRas inhibitor tipifarnib promotes CD81 lateral diffusion speed, suggesting an inhibitory role for HRas to regulate CD81 diffusion coefficient at the plasma membrane. We previously reported that hepatoma polarization limits CD81 and HCVpp diffusion coefficient (Harris et al., 2012), concluding that CD81 lateral movement plays an essential role in HCV glycoprotein-dependent particle dynamics that are essential for efficient particle entry.

Our results emphasize that TEMs are active and dynamic areas of the membrane and uncover an important role of GTPases as molecular switches to provide a functional link between TEM-associated tetraspanins and the cytoskeleton, allowing efficient coreceptor complex formation and cellular entry of viruses. Indeed, tetraspanins have been associated with the initiation of infection by various pathogens. Moreover, a recent functional siRNA screen has suggested a potential role for CD81 and HRas for influenza virus entry (Karlus et al., 2010), although their exact function in this process was not investigated. Here, we demonstrate that silencing HRas inhibits the entry of pseudoparticles expressing glycoproteins of influenza A and measles virus but not MLV or VSV. Collectively, these findings highlight a functional relevance for HRas and its role in plasma membrane compartmentalization and receptor trafficking for entry of viruses of other families. Furthermore, our results identify a mechanism to regulate CD81-dependent pathogen invasion of the liver that is HRas dependent.

Finally, our results might have therapeutic implications for the treatment of viral infections. Pharmacological interference with BRaf and HRas might provide an approach for fighting a broad range of viral infections including hepatitis C, influenza, and measles. Indeed, host-targeting agents are an emerging strategy to overcome antimicrobial resistance, a major limitation of direct-acting antivirals or antibiotics (Nathan, 2012). The recent development of safe and efficient clinically licensed small-molecule inhibitors of GTPase and BRaf (Downward, 2003; Maurer et al., 2011; Vanneman and Dranoff, 2012) provides a unique opportunity to develop host-targeting antiviral strategies. In

conclusion, our study has important impact not only for the understanding of viral entry and pathogenesis, but also for the development of preventive and therapeutic antiviral strategies.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Cell Lines and Primary Human Hepatocytes

The sources and culture conditions for 293T, Huh7, Huh7.5.1, HepG2, and HepG2-CD81 cells have been described (Lupberger et al., 2011; Mee et al., 2009). PHHs were isolated and cultured as described (Krieger et al., 2010; Lupberger et al., 2011). Polarization of HepG2-CD81 was induced as described (Mee et al., 2009).

### Patient-Derived Liver Biopsies

Liver biopsy tissues were analyzed as described (Dill et al., 2012). Liver tissue was lysed and subjected to immunoblot and phosphorylation array analysis (described below). For *ex vivo* stimulation, liver tissue was incubated for 15 min with 1 mg/ml EGF. The protocol was approved by the Ethics Committee of the University Hospital of Basel, Switzerland. Written informed consent was obtained from all patients.

### Analysis of Cell Signaling with Phosphorylation Arrays

Lysates of cells and liver biopsies were subjected to the proteome Profiler Array human phosphokinase array and human phospho-RTK array (R&D Systems) according to the manufacturer's protocol.

### Dynamic Phosphoflow Analyses

Phosphorylated forms of ERK1/ERK2 and AKT were quantified with phospho-specific antibodies in the presence of the phosphatase inhibitor pervanadate, EGF, and kinase inhibitors as described (Fraguay and Nunès, 2009). Cells were fixed, permeabilized, and incubated successively with rabbit antibodies directed against pAKT or pERK1/pERK2, biotinylated anti-rabbit antibodies, and a streptavidin-phycoerythrin solution (Beckman Coulter, Paris, France).

### Infection of Cells with Viral Pseudoparticles and Cell-Culture-Derived HCV

Lentiviral pseudoparticles expressing envelope glycoproteins from HCV (strains HCV-J and P01VL), VSV, MLV, measles, RD114, avian fowl plague influenza A (H7N1), and HCVcc (strain Luc-Jc1) were generated as described (Lupberger et al., 2011). Infection of Huh7.5.1, HepG2-CD81 cells, and PHHs with pseudoparticles and HCVcc were performed as described (Krieger et al., 2010; Lupberger et al., 2011). Unless otherwise stated, pseudoparticle entry and HCVcc infection were assessed by measurement of luciferase activity 72 hr after infection as described (Krieger et al., 2010; Lupberger et al., 2011). HCV cell-cell transmission was assayed as described (Lupberger et al., 2011) and is detailed in the Supplemental Experimental Procedures.

### Functional RNAi HCV Entry Screens

siRNA screens targeting known EGFR binding partners and CD81-associated proteins were applied in Huh7.5.1 cells as described (Lupberger et al., 2011) with ON-TARGETplus smart pools (pools of four individual siRNAs; Dharmacon). For each target, 5.25 pmol siRNA was reverse transfected in 5,000 Huh7.5.1 cells per well of a 96-well microplate with INTERFERin (Polyplus).

### Rescue of EGFR Inhibition with a HRas Transcomplementation Assay

Huh7.5.1 cells ( $0.66 \times 10^4$ ) or PHHs were seeded as described (Lupberger et al., 2011) 1 day prior to transduction with lentiviruses expressing the transdominant active HRas V12 mutant or control (Beauséjour et al., 2003). Seventy-two hours later, cells were infected with HCVpp in the presence of 10 mM erlotinib or DMSO control.

### Proteomic Analyses of Tetraspanin Complexes and Microdomains

SILAC was performed as described (Ong et al., 2002). HepG2-CD81 cells and control HepG2 were incubated with either light or heavy isotope labeled amino acids and then lysed with brij97. The two lysates were pooled, and CD81-associated proteins were coimmunoprecipitated as described (André

et al., 2006). The proteins were separated by SDS-PAGE and identified by liquid chromatography-mass spectrometry. A peak volume ratio heavy/light >2 was defined as threshold for potential CD81-associated proteins. More details are given in the Supplemental Experimental Procedures.

### Imaging Studies

FRAP was performed as described (Harris et al., 2012). Huh7.5.1 cells were transduced with GFP-labeled CD81 (AcGFP-CD81), and CD81 motility was assessed at the membrane of live cells with TIRF microscopy after photobleaching. FRET analyses of homotypic and heterotypic interactions of CD81 and CLDN1 were analyzed in Huh7.5.1 cells as described (Harris et al., 2010). The data from ten cells were normalized, and the localized expression was calculated. Confocal microscopy and staining was performed as described (Chambrion and Le Naour, 2010). Colocalization was calculated according to Pearson and Manders (Bolte and Cordelières, 2006; Manders et al., 1992). More details are given in the Supplemental Experimental Procedures.

### Statistical Analysis

All experiments were performed at least three times in triplicate in an independent manner, and results were analyzed with the nonparametric Mann-Whitney test if not indicated otherwise. An F test was performed for analysis of variance (one-way ANOVA) of colocalization studies to compare means of two groups ( $n = 3$ ) of Pearson's correlation coefficient (Rr) or ICQ. Significant p values are indicated by an asterisk in the individual figure legends.

Additional information on experimental procedures is provided in the Supplemental Experimental Procedures.

## SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes four figures, one table, and Supplemental Experimental Procedures and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2013.02.006>.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the European Union (ERC-2008-AdG-233130-HEPCENT and INTERREG-IV-Rhin Supérieur-FEDER A9 and A30), Inserm, Laboratoire d'Excellence HEPYSYS (ANR-10-LAB-28), ANRS (2010/304, 2011/132, 2012/239), and DGOS; J.A.M. acknowledges funding from the Wellcome Trust. The authors thank P. Pessaux and P. Bachellier (Strasbourg University Hospitals) for liver resections; R. Bartenschlager (University of Heidelberg, Heidelberg, Germany) for HCV strain Luc-Jc1; F.V. Chisari (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA), C.M. Rice (Rockefeller University, New York, NY), and A. Patel (University of Glasgow, Glasgow, UK) for Huh7.5.1 and Huh7.5-GFP cells; E. Campeau and C. Beauséjour for HRas V12 plasmid; D. Trono for pWPI plasmid; and C. Schuster (Inserm U1110, Strasbourg, France) for HepG2-CD81 cells. We thank A. Weiss, C. Bach, and M. Parnot for excellent technical work and Y. Couté for his helpful contributions to the SILAC analysis. L.Z. and J.L. as well as N.S.-A. and C.T. contributed equally. L.Z., J.L., F.L.N., D.S., I.H., H.J.H., A.B., M.B.Z., J.A.M., L.B., F.H.T.D., M.H.H., and T.F.B. designed experiments. L.Z., J.L., C.T., H.J.H., A.B., N.S.-A., R.G.T., F.X., M.T., S.C.D., J.F., and F.H.T.D. performed experiments. F.L.C. provided essential reagents. L.Z., J.L., F.L.N., N.S.-A., D.S., I.H., H.J.H., J.A.M., L.B., F.H.T.D., M.H.H., M.B.Z., and T.F.B. analyzed data. L.Z., J.L., F.L.N., M.B.Z., J.A.M., and T.F.B. wrote the manuscript.

Received: August 2, 2012

Revised: January 3, 2013

Accepted: February 11, 2013

Published: March 13, 2013

## REFERENCES

André, M., Le Caer, J.P., Greco, C., Planchon, S., El Nemer, W., Boucheix, C., Rubinstein, E., Chamot-Rooke, J., and Le Naour, F. (2006). Proteomic analysis of the tetraspanin web using LC-ESI-MS/MS and MALDI-FTICR-MS. *Proteomics* 6, 1437–1449.

- Barth, H., Schnober, E.K., Zhang, F., Linhardt, R.J., Depla, E., Boson, B., Cosset, F.L., Patel, A.H., Blum, H.E., and Baumert, T.F. (2006). Viral and cellular determinants of the hepatitis C virus envelope-heparan sulfate interaction. *J. Virol.* 80, 10579–10590.
- Beauséjour, C.M., Krtolica, A., Galimi, F., Narita, M., Lowe, S.W., Yaswen, P., and Campisi, J. (2003). Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J.* 22, 4212–4222.
- Berditchevski, F., and Odintsova, E. (2007). Tetraspanins as regulators of protein trafficking. *Traffic* 8, 89–96.
- Boguski, M.S., and McCormick, F. (1993). Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* 366, 643–654.
- Bolte, S., and Cordelières, F.P. (2006). A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J. Microsc.* 224, 213–232.
- Brazzoli, M., Bianchi, A., Filippini, S., Weiner, A., Zhu, Q., Pizza, M., and Crotta, S. (2008). CD81 is a central regulator of cellular events required for hepatitis C virus infection of human hepatocytes. *J. Virol.* 82, 8316–8329.
- Brown, M., Adyshev, D., Bindokas, V., Moitra, J., Garcia, J.G., and Dudek, S.M. (2010). Quantitative distribution and colocalization of non-muscle myosin light chain kinase isoforms and cortactin in human lung endothelium. *Microvasc. Res.* 80, 75–88.
- Chakraborty, S., Veetil, M.V., Bottero, V., and Chandran, B. (2012). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus interacts with EphrinA2 receptor to amplify signaling essential for productive infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109, E1163–E1172.
- Chambrion, C., and Le Naour, F. (2010). The tetraspanins CD9 and CD81 regulate CD9P1-induced effects on cell migration. *PLoS ONE* 5, e11219.
- Diao, J., Pantua, H., Ngu, H., Komuves, L., Diehl, L., Schaefer, G., and Kapadia, S.B. (2012). Hepatitis C virus induces epidermal growth factor receptor activation via CD81 binding for viral internalization and entry. *J. Virol.* 86, 10935–10949.
- Dill, M.T., Makowska, Z., Duong, F.H., Merkofer, F., Filipowicz, M., Baumert, T.F., Tornillo, L., Terracciano, L., and Heim, M.H. (2012). Interferon- $\gamma$ -stimulated genes, but not USP18, are expressed in livers of patients with acute hepatitis C. *Gastroenterology* 143, 777–786, e1–e6.
- Downward, J. (2003). Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 3, 11–22.
- El-Serag, H.B. (2012). Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 142, 1264–1273, e1.
- Evans, M.J., von Hahn, T., Tscherne, D.M., Syder, A.J., Panis, M., Wölk, B., Hatzioannou, T., McKeating, J.A., Bieniasz, P.D., and Rice, C.M. (2007). Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* 446, 801–805.
- Farquhar, M.J., Hu, K., Harris, H.J., Davis, C., Brimacombe, C.L., Fletcher, S.J., Baumert, T.F., Rappoport, J.Z., Balfe, P., and McKeating, J.A. (2012). Hepatitis C virus induces CD81 and claudin-1 endocytosis. *J. Virol.* 86, 4305–4316.
- Firaguay, G., and Nunès, J.A. (2009). Analysis of signaling events by dynamic phosphoflow cytometry. *Sci. Signal.* 2, p13.
- Harris, H.J., Davis, C., Mullins, J.G., Hu, K., Goodall, M., Farquhar, M.J., Mee, C.J., McCaffrey, K., Young, S., Drummer, H., et al. (2010). Claudin association with CD81 defines hepatitis C virus entry. *J. Biol. Chem.* 285, 21092–21102.
- Harris, H.J., Clerte, C., Farquhar, M.J., Goodall, M., Hu, K., Rassam, P., Dosset, P., Wilson, G.K., Balfe, P., Ijzendoorn, S.C., et al. (2012). Hepatoma polarization limits CD81 and hepatitis C virus dynamics. *Cell. Microbiol.* 15, 430–445.
- Jensen, L.J., Kuhn, M., Stark, M., Chaffron, S., Creevey, C., Muller, J., Doerks, T., Julien, P., Roth, A., Simonovic, M., et al. (2009). STRING 8—a global view on proteins and their functional interactions in 630 organisms. *Nucleic Acids Res.* 37(Database issue), D412–D416.
- Karlas, A., Machuy, N., Shin, Y., Pleissner, K.P., Artarini, A., Heuer, D., Becker, D., Khalil, H., Oglivie, L.A., Hess, S., et al. (2010). Genome-wide RNAi screen identifies human host factors crucial for influenza virus replication. *Nature* 463, 818–822.
- Kinbara, K., Goldfinger, L.E., Hansen, M., Chou, F.L., and Ginsberg, M.H. (2003). Ras GTPases: integrins' friends or foes? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 767–776.
- Kolch, W. (2005). Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 827–837.
- König, R., Stertz, S., Zhou, Y., Inoue, A., Hoffmann, H.H., Bhattacharyya, S., Alamares, J.G., Tscherne, D.M., Ortigoza, M.B., Liang, Y., et al. (2010). Human host factors required for influenza virus replication. *Nature* 463, 813–817.
- Krementsov, D.N., Rassam, P., Margeat, E., Roy, N.H., Schneider-Schaulies, J., Milhiet, P.E., and Thali, M. (2010). HIV-1 assembly differentially alters dynamics and partitioning of tetraspanins and raft components. *Traffic* 11, 1401–1414.
- Krieger, S.E., Zeisel, M.B., Davis, C., Thumann, C., Harris, H.J., Schnober, E.K., Mee, C., Soulier, E., Royer, C., Lambotin, M., et al. (2010). Inhibition of hepatitis C virus infection by anti-claudin-1 antibodies is mediated by neutralization of E2-CD81-claudin-1 associations. *Hepatology* 51, 1144–1157.
- Le Naour, F., André, M., Boucheix, C., and Rubinstein, E. (2006). Membrane microdomains and proteomics: lessons from tetraspanin microdomains and comparison with lipid rafts. *Proteomics* 6, 6447–6454.
- Liu, S., Yang, W., Shen, L., Turner, J.R., Coyne, C.B., and Wang, T. (2009). Tight junction proteins claudin-1 and occludin control hepatitis C virus entry and are downregulated during infection to prevent superinfection. *J. Virol.* 83, 2011–2014.
- Liu, Z., Tian, Y., Machida, K., Lai, M.M., Luo, G., Fong, S.K., and Ou, J.H. (2012). Transient activation of the PI3K-AKT pathway by hepatitis C virus to enhance viral entry. *J. Biol. Chem.* 287, 41922–41930.
- Lupberger, J., Zeisel, M.B., Xiao, F., Thumann, C., Fofana, I., Zona, L., Davis, C., Mee, C.J., Turek, M., Gorke, S., et al. (2011). EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy. *Nat. Med.* 17, 589–595.
- Manders, E.M., Stap, J., Brakenhoff, G.J., van Driel, R., and Aten, J.A. (1992). Dynamics of three-dimensional replication patterns during the S-phase, analysed by double labelling of DNA and confocal microscopy. *J. Cell Sci.* 103, 857–862.
- Maurer, G., Tarkowski, B., and Baccarini, M. (2011). Raf kinases in cancer roles and therapeutic opportunities. *Oncogene* 30, 3477–3488.
- Mee, C.J., Harris, H.J., Farquhar, M.J., Wilson, G., Reynolds, G., Davis, C., van Ijzendoorn, S.C., Balfe, P., and McKeating, J.A. (2009). Polarization restricts hepatitis C virus entry into HepG2 hepatoma cells. *J. Virol.* 83, 6211–6221.
- Mercer, J., and Helenius, A. (2008). Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells. *Science* 320, 531–535.
- Morandell, S., Stasyk, T., Skvortsov, S., Ascher, S., and Huber, L.A. (2008). Quantitative proteomics and phosphoproteomics reveal novel insights into complexity and dynamics of the EGFR signaling network. *Proteomics* 8, 4383–4401.
- Morello, V., Cabodi, S., Sigismund, S., Camacho-Leal, M.P., Repetto, D., Volante, M., Papotti, M., Turco, E., and Defilippi, P. (2011). b1 integrin controls EGFR signaling and tumorigenic properties of lung cancer cells. *Oncogene* 30, 4087–4096.
- Moro, L., Venturino, M., Bozzo, C., Silengo, L., Altruda, F., Beguinot, L., Tarone, G., and Defilippi, P. (1998). Integrins induce activation of EGF receptor: role in MAP kinase induction and adhesion-dependent cell survival. *EMBO J.* 17, 6622–6632.
- Murray, C.L., and Rice, C.M. (2011). Turning hepatitis C into a real virus. *Annu. Rev. Microbiol.* 65, 307–327.
- Nathan, C. (2012). Fresh approaches to anti-infective therapies. *Sci. Transl. Med.* 4, sr2.
- Ong, S.E., Blagojev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D.B., Steen, H., Pandey, A., and Mann, M. (2002). Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* 1, 376–386.

- Pelkmans, L., Fava, E., Grabner, H., Hannus, M., Habermann, B., Krausz, E., and Zerial, M. (2005). Genome-wide analysis of human kinases in clathrin- and caveolae/raft-mediated endocytosis. *Nature* 436, 78–86.
- Pileri, P., Uematsu, Y., Campagnoli, S., Galli, G., Falugi, F., Petracca, R., Weiner, A.J., Houghton, M., Rosa, D., Grandi, G., and Abrignani, S. (1998). Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 282, 938–941.
- Ploss, A., Evans, M.J., Gaysinskaya, V.A., Panis, M., You, H., de Jong, Y.P., and Rice, C.M. (2009). Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature* 457, 882–886.
- Sainz, B., Jr., Barretto, N., Martin, D.N., Hiraga, N., Imamura, M., Hussain, S., Marsh, K.A., Yu, X., Chayama, K., Alrefai, W.A., and Uprichard, S.L. (2012). Identification of the Niemann-Pick C1-like 1 cholesterol absorption receptor as a new hepatitis C virus entry factor. *Nat. Med.* 18, 281–285.
- Scarselli, E., Ansuini, H., Cerino, R., Roccasecca, R.M., Acali, S., Filocamo, G., Traboni, C., Nicosia, A., Cortese, R., and Vitelli, A. (2002). The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J.* 21, 5017–5025.
- Silvie, O., Rubinstein, E., Franetich, J.F., Prenant, M., Belnoue, E., Rénia, L., Hannoun, L., Eling, W., Levy, S., Boucheix, C., and Mazier, D. (2003). Hepatocyte CD81 is required for *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium yoelii* sporozoite infectivity. *Nat. Med.* 9, 93–96.
- Stewart, P.L., and Nemerow, G.R. (2007). Cell integrins: commonly used receptors for diverse viral pathogens. *Trends Microbiol.* 15, 500–507.
- Tian, T., Harding, A., Inder, K., Plowman, S., Parton, R.G., and Hancock, J.F. (2007). Plasma membrane nanoswitches generate high-fidelity Ras signal transduction. *Nat. Cell Biol.* 9, 905–914.
- Vanneman, M., and Dranoff, G. (2012). Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment. *Nat. Rev. Cancer* 12, 237–251.
- Wickström, S.A., and Fässler, R. (2011). Regulation of membrane traffic by integrin signaling. *Trends Cell Biol.* 21, 266–273.
- Zeisel, M.B., Fofana, I., Fafi-Kremer, S., and Baumert, T.F. (2011). Hepatitis C virus entry into hepatocytes: molecular mechanisms and targets for antiviral therapies. *J. Hepatol.* 54, 566–576.



Cell Host & Microbe, Volume 13

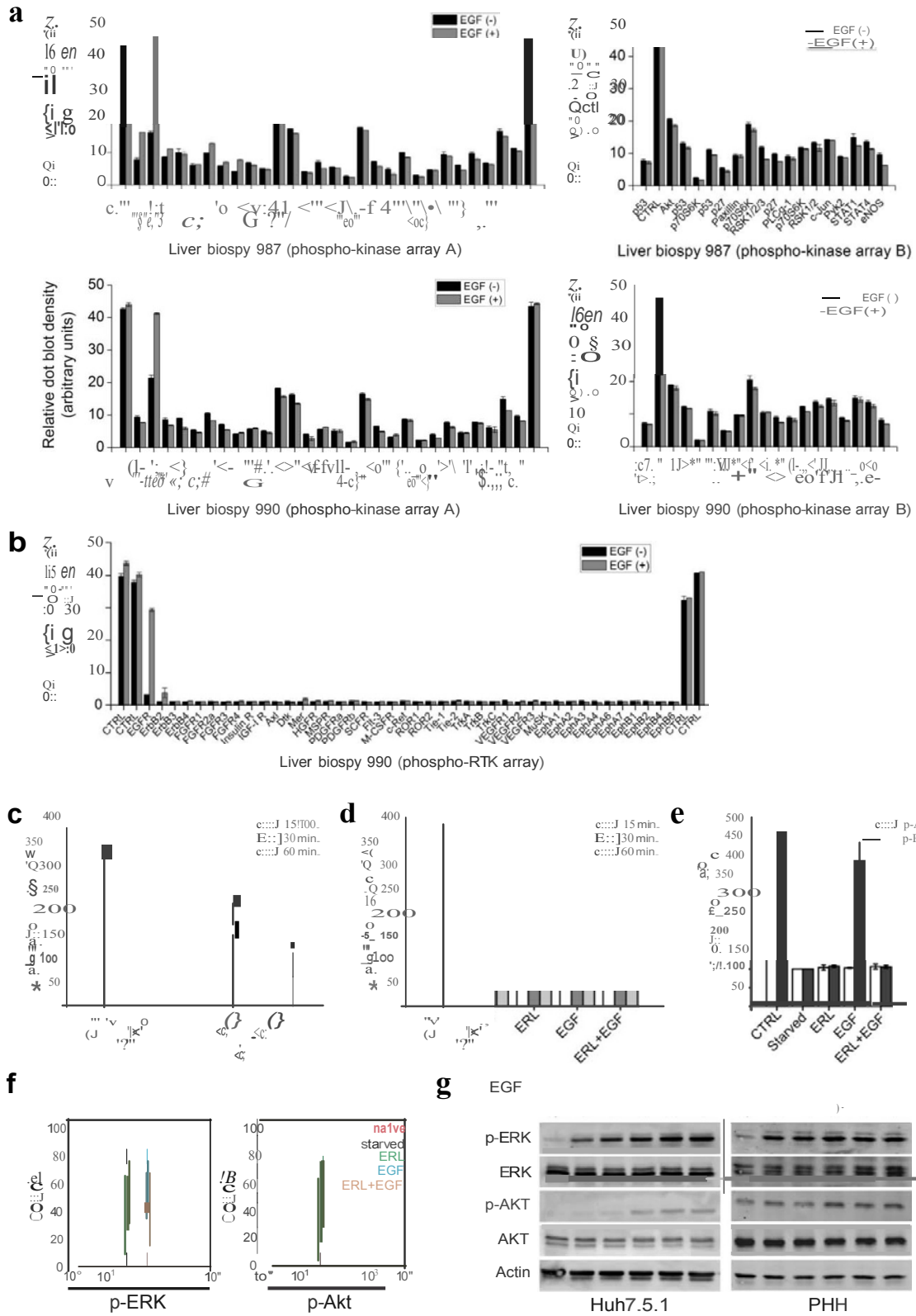
## Supplemental Information

### HRas Signal Transduction Promotes

### Hepatitis C Virus Cell Entry by Triggering

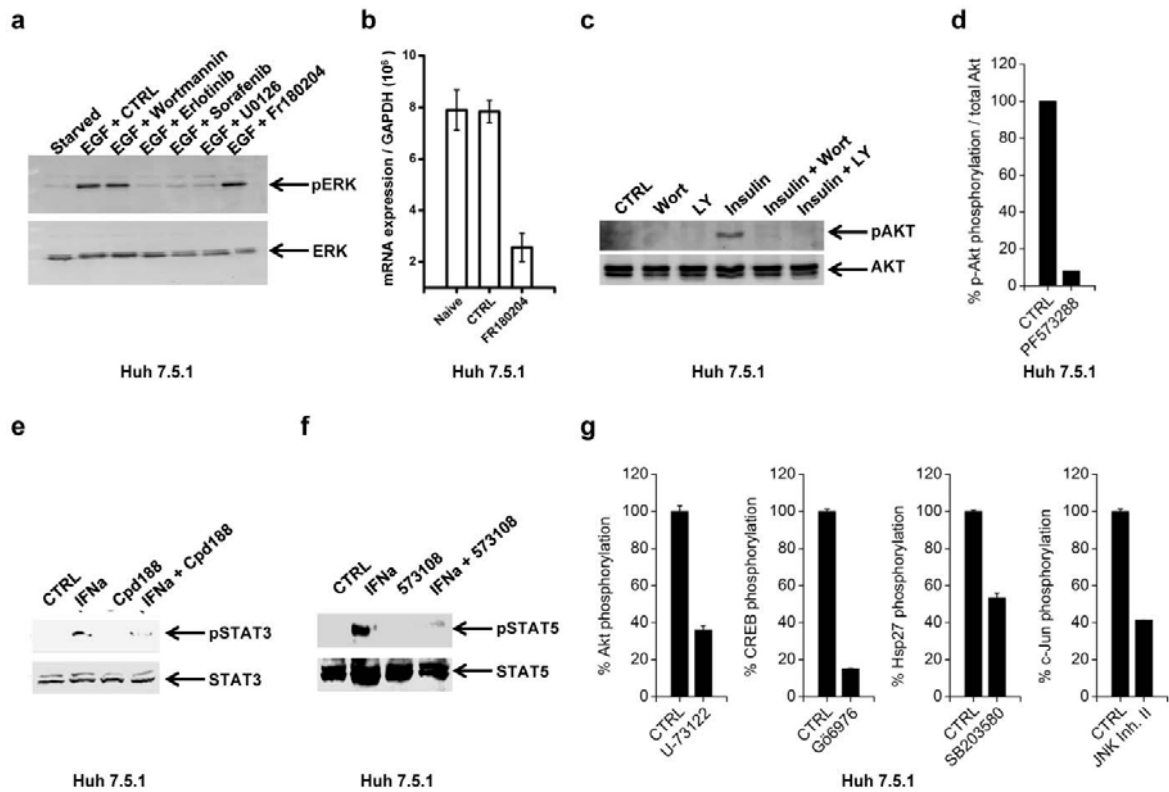
### Assembly of the Host Tetraspanin Receptor Complex

Laetitia Zona, Joachim Lupberger, Nazha Sidahmed-Adrar, Christine Thumann, Helen J. Harris, Amy Barnes, Jonathan Florentin, Rajiv G. Tawar, Fei Xiao, Marine Turek, Sarah C. Durand, François H.T. Duong, Markus H. Heim, François-Loïc Cosset, Ivan Hirsch, Didier Samuel, Laurent Brino, Mirjam B. Zeisel, François Le Naour, Jane A. McKeating, and Thomas F. Baumert



**Figure S1. EGFR predominantly induces MAPK signaling in Huh7.5.1 cells, primary human hepatocytes and patient-derived liver tissue, Related to Figure 1**

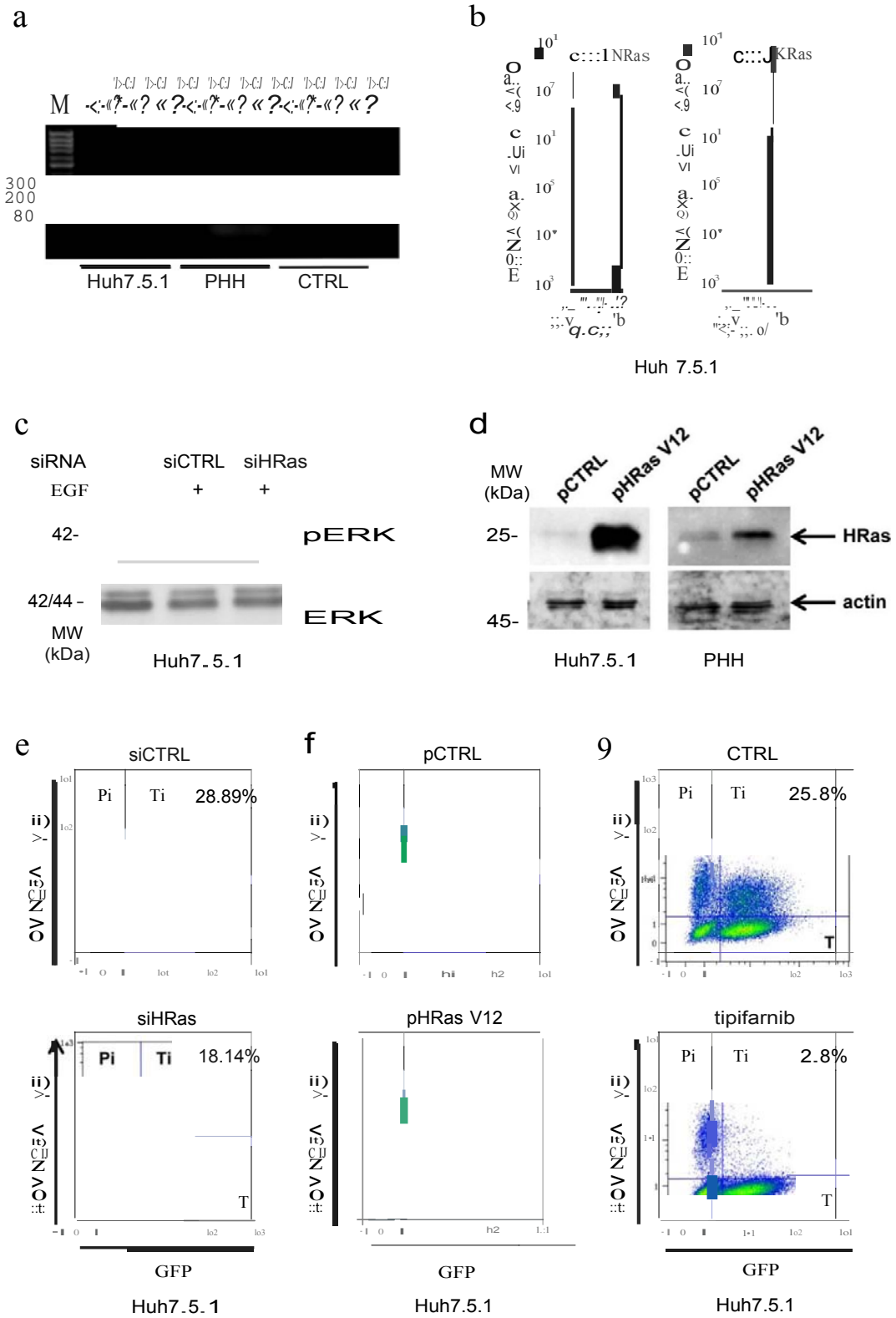
**(a,b)** Freshly isolated liver tissue of liver biopsies (987, 990 – shown in Fig. 1c) was incubated with EGF (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 15 min) or mock control *ex vivo*. Following cell lysis, liver cell kinase phosphorylation was analyzed using a phospho-kinase array **(a)** and a phospho-RTK array **(b)** comprising the kinases and signal transducers indicated on the x-axis. Blots were exposed to hyperfilms and films were digitalized using a flatbed scanner and analyzed using Image J software (NIH). The relative dot-blot density of the phosphorylated proteins in samples incubated with EGF compared to mock-treated liver tissue was quantified by elliptical selection of individual dots and measuring standard deviation and integrated density. Means  $\pm$  s.d. from two dots spotted with the same capture antibody are shown. **(c-f)** Phosphoflow analysis of the phosphorylated forms of ERK1/2 **(c,e,f)** and AKT **(d,e,f)** using phospho-specific antibodies in Huh7.5.1 cells **(c,d,f)** or PHHs incubated with EGF **(e)**. Cells were serum-starved for 12 h prior incubation with pervanadate (CTRL), that prevents dephosphorylation of kinases by phosphatases and results in the accumulation of the phosphorylated forms of ERK1/2 and AKT, in combination with the EGFR-inhibitor erlotinib (10  $\mu\text{M}$ ), the EGFR-ligand EGF (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), or both compounds for 15, 30 and 60 min for Huh7.5.1 cells or for 15 min for PHHs. Cells were then fixed, permeabilized, and incubated successively with antibodies directed against pAKT or pERK1/2, biotinylated secondary antibodies and a streptavidin-phycoerythrin solution. ERK1/2 and AKT phosphorylation was then assessed using flow cytometry. Data are expressed as percentage phosphorylation of ERK1/2 or AKT relative to untreated starved cells (means  $\pm$  s.d. from two experiments in triplicate for Huh7.5.1,  $n=6$  or means  $\pm$  s.d. from three experiments for PHHs,  $n=3$ ). **(f)** FACS histograms displaying the results shown in **(c)** and **(d)** after 15 min of incubation with EGF. **(g)** Immunoblot analysis of ERK1/2 and AKT phosphorylation in serum-starved Huh7.5.1 cells (left panel) and PHHs (right panel) incubated with EGF. Cells were incubated for 15 min with EGF at various concentrations prior to cell lysis. ERK and AKT phosphorylation as well as total ERK, AKT and actin expression were analyzed by immunoblot with specific antibodies.



**Figure S2. Functional confirmation of the biological activity of small molecule inhibitors targeting signal transduction pathways, Related to Figure 3**

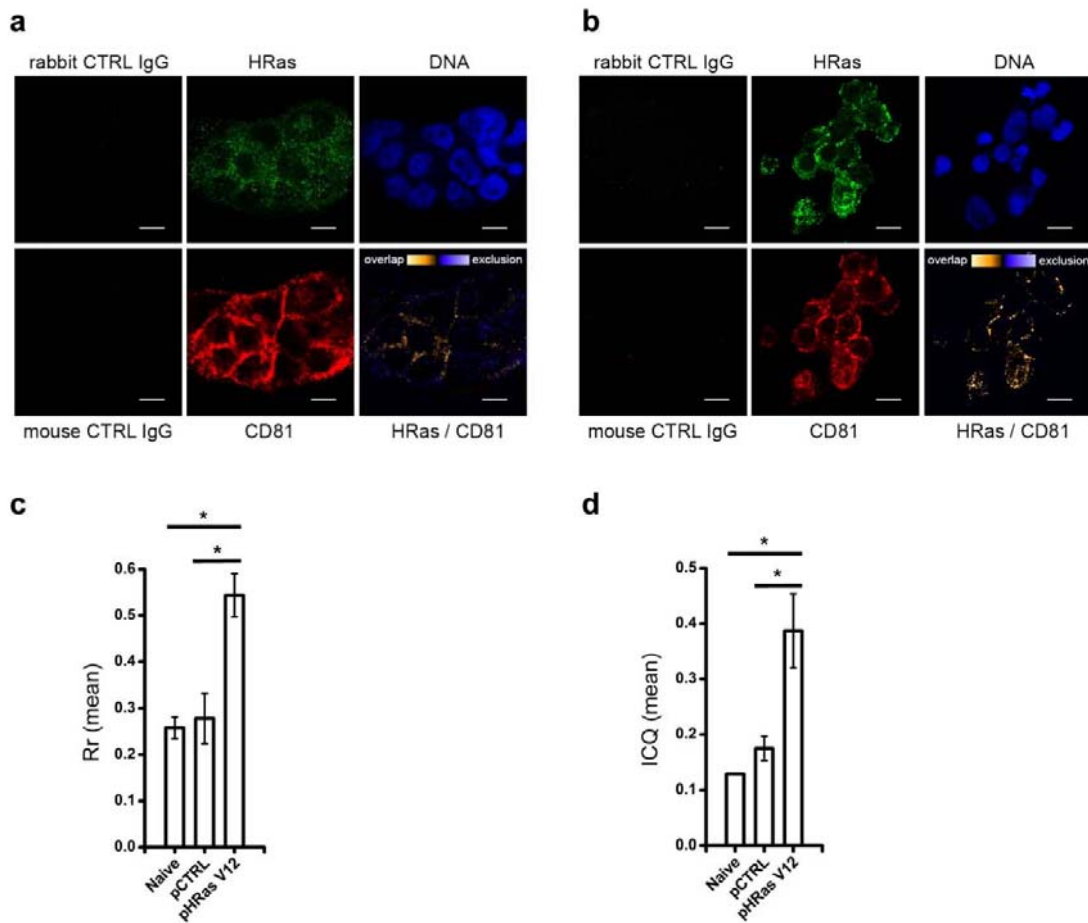
**(a)** The biological activity of MAPK inhibitors erlotinib (Lupberger et al., 2011; Shepherd et al., 2005), sorafenib (Bruix et al., 2012), U0126 (Duncia et al., 1998), Fr180204 (Ohori et al., 2005) and PI3K inhibitor wortmannin (Nakae et al., 1999) were assessed in starved Huh7.5.1 cells treated with EGF (1  $\mu$ g/mL) and DMSO control or the indicated inhibitors (10  $\mu$ M) by detection of ERK1/2 phosphorylation. ERK1/2 expression and phosphorylation were measured by specific antibodies targeting pERK1/2 or ERK1/2 by immunoblotting. **(b)** The biological activity of Fr180204 inhibiting ERK1/2 kinase activity (Ohori et al., 2005) was assessed measuring the expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) which is regulated by MAPK signaling (Lupberger et al., 2006). mRNA expression after 24 h in starved Huh7.5.1 cells treated with Fr180204 inhibitor (10  $\mu$ M) compared to control treated cells. mRNA expression of PCNA is shown as relative to GAPDH expression. **(c)** The biological activity of PI3K inhibitors wortmannin (Wort) (Nakae et al., 1999) and LY294,002 (LY) (Casagrande et al., 1998) (10  $\mu$ M) was assessed by inhibition of AKT phosphorylation induced by insulin (100 nM, 1 h) as described (Nakae et al., 1999). Detection of pAKT compared to total AKT in Huh7.5.1 cells was performed by immunoblot. **(d)** The biological activity of FAK inhibitor PF573288 (Slack-Davis et al., 2007) (10  $\mu$ M) was confirmed by inhibition of basal pAKT phosphorylation (Huang et al., 2002). Detection of pAKT compared to total AKT in Huh7.5.1 cells was performed by immunoblot and quantified using Image Quant. **(e,f)**

The biological activity of STAT3 inhibitor Cpd188 (Xu et al., 2009) **(e)** or STAT5 inhibitor 573108 (Muller et al., 2008) **(f)** (10  $\mu$ M each) was assessed by their effect on IFN $\alpha$ -induced (1000 U/mL, 15 min) STAT3 or STAT5 phosphorylation, respectively. **(g)** The biological activity of PLC inhibitor U-73122 (Bleasdale et al., 1990) (inhibiting pAKT), PKC inhibitor Gö6976 (Martiny-Baron et al., 1993) (inhibiting pCREB), p38 inhibitor SB203580 (Davies et al., 2000) (inhibiting pHsp27) or JNK inhibitor II (Han et al., 2001) (inhibiting pc-Jun) (10  $\mu$ M for each inhibitor) was confirmed by inhibition of PMA-induced (0.5  $\mu$ g/mL, 1 h) phosphorylation of the respective target substrate protein in Huh7.5.1 cells. Substrate phosphorylation was measured using phospho-kinase array and relative dot-blot density of this array was quantified using ImageJ software (NIH) (means  $\pm$  s.d. from two dots spotted with the same capture antibody). All experiments were performed in Huh7.5.1 cells using the inhibitor concentration indicated. Inhibitors were added for 1 h to the cells and phosphorylation was assessed using the human phospho-kinase array in cell lysates as described in Experimental Procedures. Data are expressed as percentage of substrate protein phosphorylation in the presence of PMA and inhibitor compared to PMA-treated cells alone. Relative dot blot densities are normalized by the positive controls spotted on each array.



**Figure S3. Cellular HRas expression and its effects on HCV cell-cell transmission, Related to Figure 4**

**(a)** Expression of HRas, KRas and NRas in Huh7.5.1 cells and PHHs. HRas, KRas and NRas mRNA expression in Huh7.5.1 cells and in PHHs was analyzed by RT-PCR using isoform-specific primers. The RT-PCR products were subjected to gel electrophoresis using 2 % agarose gel. The respective RT-PCR products are indicated. **(b)** HRas silencing is isoform-specific and does not impair the expression of KRas and NRas. Huh7.5.1 cells were transfected with siHRas.6 or siHRas.7 or siKRas.1 or siNRas.5 for 72 h prior to detection of mRNA expression of KRas and NRas by RT-PCR. mRNA expression of KRas and NRAs compared to GAPDH after silencing. (means  $\pm$  s.d. from one representative experiment in duplicate, n=2). **(c)** HRas silencing reduces ERK phosphorylation after EGF stimulation. Huh7.5.1 cells were transduced with siHRas.6 for 72 h. The cells were serum starved for 6 h and then incubated with EGF (1  $\mu$ g/mL) for 10 min prior to cell lysis. ERK phosphorylation and total ERK expression were analyzed by immunoblot with specific antibodies. **(d)** Enhancement of HRas expression in Huh7.5.1 cells and PHHs 72 h after transduction with control lentiviruses (pCTRL) or lentiviruses expressing a trans-dominant active HRas mutant (pHRas V12). HRas expression was assessed using an HRas-specific antibody in cell lysates. **(e-g)** Modulation of HRas expression and function alters HCV cell-cell transmission in Huh7.5.1 cells. HCV producer cells (Lupberger et al., 2011) were cultured with **(e)** HRas-silenced GFP-positive target cells (siHRas.6) or with GFP-positive target cells transfected with control siRNA (siCTRL) or with **(f)** HRas lentivirus-transduced target cells (pHRas V12) or with **(g)** target cells transduced with control expression plasmid (pWPI) or with uninfected GFP-positive target cells incubated with tipifarnib (10  $\mu$ M) or mock control. Cell-free HCV transmission was blocked by incubation of cells with patient-derived neutralizing anti-HCV IgG (Fofana et al., 2012) as described (Lupberger et al., 2011; Witteveldt et al., 2009). HCV-infected GFP-positive target cells were detected by staining using an HCV non structural protein 5A (NS5A)-specific antibody and quantified by flow cytometry as described in Experimental Procedures. The percentage of HCV infected GFP-positive target cells is indicated. Total cells = 100 %, Pi = HCV RNA-electroporated Huh7.5.1 producer cells, T = GFP-expressing Huh7.5 target cells with absent infection and Ti = GFP+HCV NS5A+ HCV-infected target cells.



**Figure S4. Co-localization of HRas with CD81 in Huh7 cells, Related to Table 1**

**(a-d)** Confocal laser scan microscopy analysis of HRas (green) and CD81 (red) co-immunostaining in Huh7 cells. DAPI staining of DNA (blue) served as nuclear marker for cells. Cells were fixed with 4 % para-formaldehyde, permeabilized, and immunolabeled with rabbit polyclonal anti-HRas and mouse monoclonal anti-CD81 antibodies. Following washing bound antibodies were visualized using Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG or Alexa Fluor 594 goat anti-mouse IgG and confocal laser scan microscopy. Scale bar represents 10  $\mu$ m. Co-localization was measured by Image J software (NIH) and calculated according to Pearson coefficient (Rr) and Intensity Correlation Quotient (ICQ) (Bolte and Cordelieres, 2006; Brown et al., 2010; French et al., 2008; Zinchuk et al., 2007). **(a)** Co-localization of CD81 and endogenous HRas in naïve Huh7 cells. **(b)** Overexpression of transdominant active HRas V12 results in an increase of HRas co-localization with endogenous CD81. Huh7 cells were transduced for 48 h with control (pCTRL) or HRas V12 lentiviruses. **(c,d)** Co-localization of endogenous CD81 with active HRas is significantly and reproducibly increased as calculated by analysis of variance using F-test from Pearson's correlation coefficients (Rr) **(c)** or Intensity Correlation Quotients (ICQ) **(d)**, respectively. (means  $\pm$  s.d. from three independent experiments, n=3). \*p<0.005.



**Table S1. Functional siRNA HCVpp entry screen of EGFR binding partners in Huh7.5.1 cells, Related to Figure 2**

<b>Target name</b>	<b>Mean % HCVpp entry</b>	<b>SD</b>
<b>Naive</b>	116.29	10.16
<b>CTRL</b>	100.00	10.48
<b>CD81</b>	6.62	2.53
<b>GRB2</b>	43.57	13.31
<b>GAB1</b>	70.14	2.25
<b>SHC1</b>	45.28	14.36
<b>PTPN11</b>	70.64	10.87
<b>PLCG1</b>	64.03	13.83
<b>RASA1</b>	79.12	18.43
<b>CSK</b>	58.28	5.97
<b>SH3BP1</b>	52.30	2.37
<b>STAT3</b>	59.34	10.37
<b>STAT5A</b>	66.91	3.69
<b>STAT5B</b>	44.64	1.06
<b>VAV2</b>	92.68	10.74
<b>CBL</b>	136.12	18.44
<b>EPS15</b>	124.09	13.14

Expression of EGFR binding partners were silenced in Huh7.5.1 cells using target-specific siRNAs (onTarget plus pool of four siRNA). 72 h later cells were infected with HCVpp (genotype 1b) and HCVpp infection was analyzed as described in Supplementary Experimental Procedures. Data are expressed as percentage HCVpp entry relative to siCTRL-transfected cells (mean  $\pm$  s.d.). A threshold of five times the median of standard deviations on a plate (equals 47.96 residual infectivity) was chosen as a stringent parameter defining positive screening hits (Brass et al., 2008).

## SUPPLEMENTAL EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Protein kinase inhibitors, ligands and antibodies.** Erlotinib was obtained from LC Laboratories. Sorafenib, Fr180204, Raf-1 Kinase Inhibitor I, Raf Kinase Inhibitor VI, U-73122, JNK inhibitor II, SB203580, Gö6976, STAT5 inhibitor (573108) and DMSO (used at a final concentration 0.7 % for incubation of protein kinase inhibitors and control experiments) were obtained from Merck. Tipifarnib and wortmannin were obtained from Selleckchem. U0126 and Cpd188 were obtained from Calbiochem. PF573288 was obtained from Pfizer. Recombinant EGF, LY294,002 and the  $\beta$ -actin-specific antibody were obtained from Sigma; antibody to EGFR (clone 528) and to Rap2B (sc-81915) from Santa Cruz; antibody to actin (EP1123Y) and HRas (Y132) from Abcam. Antibodies specific for CD81 (JS81), HRas (clone 18), Shc1, Grb2 (clone 81), and integrin beta1 (CD29, clone 9E67) were obtained from BD Transduction Laboratories. Gab1- and ERK1/2-specific antibodies as well as phospho-specific antibodies directed against pERK1/2 (Thr202, Tyr204) (E10) were obtained from Cell Signaling. Anti-HCV IgG has been described (Fofana et al., 2012). Antibodies p-ERK1/2 (Thr202, Tyr204) (E10) labeled with Alexa Fluor 488 and p-AKT (Ser473) (D9E) labeled with Alexa Fluor 647 used for dynamic phosphoflow analyses were obtained from Beckman Coulter. All other antibodies labeled with the fluorophores Alexa Fluor 488 and Alexa Fluor 594 were obtained from Invitrogen. Antibody specific for CD81 (TS81) for immunoprecipitation and immunofluorescence was obtained from Diaclone. Antibody specific for claudin-1 (1C5–D9) was obtained from Abnova. Alkaline-phosphatase (AP)-labeled secondary antibodies were obtained from GE Healthcare. Secondary antibodies IRDye IgG (800CW and 680RD) were obtained from LI-COR Biosciences.

**Infection of primary human hepatocytes.** One day following PHH isolation and plating (Krieger et al., 2010), PHHs were washed with PBS and pre-incubated in the presence or absence of ligand or inhibitors for 1 h at 37 °C in William's E medium. Then, lentiviral-based HCVpp or VSVpp were added for 4 h at 37 °C and the plates were centrifuged the first hour at 37 °C at 400 x g. Following infection, fresh medium was added.

**Analyses of protein expression.** Immunoblots of cell lysates using protein-specific antibodies were performed following GE Healthcare protocols using Hybond-P membranes and visualized using ECF substrate and Typhoon Trio high performance fluorescence scanner (GE Healthcare). Immunoblots of biopsies were analyzed using Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR). Phospho-array analysis was performed using Proteome Profiler Human Phospho-kinase Array and Human Phospho-RTK Array (R&D Systems) as described by the manufacturer. For imaging blots were incubated with ECL (GE Healthcare) and exposed to ECL Hyperfilm (GE Healthcare).

**Functional RNAi HCV entry screens.** Custom Plate (pool of four siRNA) libraries were obtained from Dharmacon for EGFR binding partner and STRING network siRNA screens. For each target 5.25 pmol siRNA was reverse transfected in 5,000 Huh7.5.1 cells per well of 96-well microplate using INTERFERin reagent (Polyplus). The effect of gene silencing on viral entry was investigated 72 h after siRNA transfection using

HCVpp (genotype 1b) harboring a luciferase reporter gene. To minimize non-specific effects due to evaporation, outside wells were not used for the screens but were filled with phosphate buffered saline (PBS). As an internal quality control of gene silencing and HCVpp entry, positive control siRNA (siCD81) was transfected side-by-side on each plate. Hit selection after siRNA screening: the impact of gene silencing was defined by an increase or decrease of HCVpp entry expressed as the ratio of entry compared to the experimental average value of entry into control-transfected cells (irrelevant siRNA). For HCVpp entry a threshold of five times the median of standard deviations inhibition on a plate was chosen as a stringent parameter defining screening hits similar as described (Brass et al., 2008).

**MTT assay.** Cytotoxic effects on cells were assessed by analyzing the ability to metabolize 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) as described elsewhere (Lupberger et al., 2011).

**siRNAs and expression plasmids used for rescue experiments and functional studies.** Custom onTARGET plus (pool of four individual siRNA) siRNA libraries comprising EGFR binding partners and CD81 associated proteins were obtained from Dharmacon. Individual onTarget plus siRNAs siITGB1.2 (J-004506-06, 5'-GGU AGA AAG UCG GGA CAA A-3'), siITGB1.4 (J-004506-08, 5'-GGG CAA ACG UGU GAG AUG U-3'), RAP2B.3 (J-009052-07, 5'-CAA UAG GGC CUG UUG UUU A-3'), RAP2B.4 (J-009052-08, 5'-GAA AUU AGG AAC ACU GCU A-3') were obtained from Dharmacon. siGab1 (Hs-Gab1\_6, 5'-TAG ATG CTG GAT TGA CAT TTA-3'), siGrb2 (Hs-Grb2\_1, 5'-CTG GTA TTC TCT CTA TGC AAA-3'), siShc1 (Hs-Shc1\_9, 5'-AAG AGC CAC CTG ACC ATC AGT-3'), siHRas.6 (Hs-HRas\_6, 5'-CCG GAA GCA GGT GGT CAT TGA-3'), siHRas.7 (Hs-HRas\_7, 5'-CAC AGA TGG GAT CAC AGT AAA-3'), siKRas.1 (Hs-KRas\_1, 5'-GAC GAT ACA GCT AAT TCA GAA-3'), siKRas.8 (Hs-KRas2\_8, 5'-AAG GAG AAT TTA ATA AAG ATA-3'), siNRas.5 (Hs-NRas\_5, 5'-AAC CTG TTT GTT GGA CAT ACT-3'), siNRas.11 (Hs-NRas\_11, 5'-AGG GAG CAG ATT AAG CGA GTA-3') and siBRAF (Hs-BRAF\_4, 5'-TAG AGT CTT CCT GCC CAA CAA-3') were obtained from Qiagen. siCTRL, siCD81 and siEGFR (Hs-siEGFR\_6) have been described (Lupberger et al., 2011; Zeisel et al., 2007). Lentiviral expression plasmids pWPI, a lentiviral cDNA expression vector containing a co-cistronic GFP reporter (plasmid 12254) and pLenti CMV/TO RasV12 Puro (HRas V12, plasmid 22262) were obtained from Addgene.

**Silencing, inhibition, and ligand experiments.** Silencing was performed using INTERFERin (Polyplus) and DharmaFECT4 (Dharmacon) as described (Lupberger et al., 2011). Screening was performed at the High Throughput Screening (HTS) platform of the Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC) in Illkirch, France. Inhibitors, antibodies or ligand were added 1 h prior to HCVpp entry or HCVcc infection and during entry/infection unless otherwise stated. Experiments with EGFR ligand were conducted on serum-starved cells.

**Cell-cell transmission of HCV.** Cell-cell transmission of HCV was assessed as previously described (Lupberger et al., 2011; Witteveldt et al., 2009). Briefly, Huh7.5.1

producer cells were electroporated with HCV Jc1 RNA and cultured with naïve Huh7.5-GFP target cells, or target cells with silenced HRas expression, or overexpressed transdominant active HRas V12, or in the presence or absence of tipifarnib (10  $\mu$ M). Cell-free transmission was blocked by patient-derived anti-HCV IgG (Fofana et al., 2012) as described (Lupberger et al., 2011).

**Analyses of mRNA expression.** Total RNA was extracted from Huh7.5.1 cells and PHHs using RNeasy Mini Kit (Qiagen). Gene expression in the total RNA extracts was assessed using two step RTqPCR. The reverse transcription on total RNA extract was made using MAXIMA reverse transcriptase (Thermo Scientific). RTqPCR for expression of HRas, KRas, NRas, PCNA and GAPDH was made using SOLARIS qPCR Master mix in combination of qPCR Gene Expression Assay (Thermo Scientific) and RT-PCR was performed using Corbett Rotor Gene 6000 (Qiagen). All RTqPCR steps were performed following protocols provided with the different kits. Serial dilutions of a standard were included for each gene to generate a standard curve to allow calculation of the input amount of cDNA for each gene. All values were normalized by GAPDH expression.

**Analyses of liver biopsies.** Eligible patients were identified by a systematic review of patient charts at the Hepatology outpatient clinic of the University Hospital of Basel, Switzerland. The protocol was approved by the Ethics Committee of the University Hospital of Basel, Switzerland. Written informed consent was obtained from all patients. Histopathological grading and staging of the HCV liver biopsies according to the Metavir classification system was performed at the Pathology Institute of the University Hospital Basel. All the patients that donated liver tissue were male, between 39 and 57 years old and diagnosed with non-alcoholic steatohepatitis (liver biopsies 956, 968), primary sclerosing cholangitis (liver biopsy 965), hepatitis B (liver biopsy 987), or toxic hepatitis (liver biopsy 990). Biopsy liver tissues were analyzed as described (Dill et al., 2012). In brief, liver tissue was lysed in 100 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7.5, 1 mM EDTA, 0.1 % Triton X-100, 10 mM NaF, 1 mM PMSF, and 1 mM sodium ortho-vanadate during mechanic homogenization followed by 20 min incubation on ice. Lysates were cleared by centrifugation at 4 °C and 21,000 x g for 5 min prior to immunoblot analysis of 30  $\mu$ g protein per sample. For *ex vivo* stimulation, liver tissues were incubated for 15 min with 1  $\mu$ g/mL EGF. Liver tissue was grinded in liquid nitrogen and lysed using lysis buffer 6 (R&D Systems) supplemented with protease and phosphatase inhibitors. Lysates were cleared after 20 min incubation on ice by centrifugation and analyzed by phospho-array.

**Proteomic analyses of tetraspanin complexes and microdomains.** Stable isotope labeling with amino acids in cell culture (SILAC) was performed as described (Ong et al., 2002). In brief, HepG2-CD81 cells and control HepG2 were incubated with either light isotope-labeled  $^{12}\text{C}_6$ -lysine/ $^{12}\text{C}_6$ -arginine or heavy isotope-labeled amino-acids  $^{13}\text{C}_6$ -lysine/ $^{13}\text{C}_6$ -arginine (ThermoScientific). It was confirmed that during 6-8 rounds of mitosis at least 98 % of proteins incorporated labeled amino-acids and that during the experiment labeled arginine was not transformed into proline. Then,  $1.2 \times 10^8$  cells HepG2 and HepG2-CD81 were lysed using brij97 (10 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 % brij97) in the presence of protease inhibitors. The two

lysates were pooled and CD81-associated proteins were co-immunoprecipitated as described (Andre et al., 2006). Isolation of CD81-containing TEMs was performed using the CD81-specific antibody TS81 coupled covalently to sepharose 4B beads (Amersham Bioscience, Saclay, France). The beads were washed five times with lysis buffer and proteins were eluted using 1 % Triton X-100. The proteins were separated by 12 % SDS-PAGE under non-reducing conditions and directly trypsin-digested in gel pieces as described (Andre et al., 2006). Resulting peptides were analyzed by liquid chromatography mass spectrometry using LTQ-Orbitrap Velos spectrometer (ThermoScientific) coupled with nano-HPLC liquid chromatography (Ultimate 3000, Dionex) and identified using the software MaxQuant (<http://maxquant.org>) by comparing the results with a human protein database and a control database containing scrambled sequences. For each protein, the identification was considered as valid when at least 2 different peptides were sequenced by mass spectrometry. Proteins specifically associated with CD81 were designated by an exclusive  $^{12}\text{C}$  or  $^{13}\text{C}$  labeling, whereas contaminating proteins were labeled similarly with both light and heavy isotopes  $^{12}\text{C}$  and  $^{13}\text{C}$ , which appeared as doublets in the mass spectra. A peak volume ratio  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  (heavy/light)  $>2$  was defined as threshold for potential CD81-associated proteins.

**Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP).** Cells transduced to express AcGFP-CD81 were plated onto Mattek glass bottomed dishes at a density of  $1.5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> and imaged using a 100x Plan Apochromat 1.4NA oil immersion objective on a Zeiss LSM 780 confocal microscope with a GaAsP spectral detector. 16 bit images were attained with optimal pixel resolution. Tagged proteins were excited with the argon 488 laser and initial images acquired with low laser power (0.1-1 % transmission), photobleaching was performed with full laser power for 20 iterations on selected circular regions of interest (ROI) identified in the planar membrane. Subsequent recovery images were collected using low laser power at 0.18 second intervals for approximately 2 min, until ROI recovery had reached a plateau. Only a single Z-section was bleached and imaged, typically the basal side of the cell contacting the cover slip. The mean fluorescent intensity over time was obtained for the photo-bleached ROI, a background ROI (containing no cells) and an unbleached ROI in the cell of interest. ROIs were selected using the Zeiss Zen analysis software. Changes in fluorescence following photobleaching were normalized for fluctuations in image capture, laser power and overall fluorescence loss in the cells by subtracting the background and unbleached ROI. The values obtained for the photo-bleached ROI were converted to relative fractional recovery, where the pre-bleach fluorescence intensity values equal to 100 %. Data were imported into GraphPad Prism and fitted using an exponential decay algorithm,  $Y = \text{Span} (1 - \exp(-K \cdot X)) + \text{plateau}$ . The span and plateau were used to calculate mobile fraction. The diffusion coefficient (D) was calculated using a simple two-dimensional diffusion model for a circular bleach ROI:  $D = 0.224 \times (\text{radius}^2/t_{1/2})$  (Axelrod et al., 1976). Bootstrap Monte Carlo sampling demonstrated that a minimum of 10 cells and 100 ROIs were required to represent the population.



**SUPPLEMENTAL REFERENCES**

Andre, M., Le Caer, J.P., Greco, C., Planchon, S., El Nemer, W., Boucheix, C., Rubinstein, E., Chamot-Rooke, J., and Le Naour, F. (2006). Proteomic analysis of the tetraspanin web using LC-ESI-MS/MS and MALDI-FTICR-MS. *Proteomics* 6, 1437-1449.

Axelrod, D., Koppel, D.E., Schlessinger, J., Elson, E., and Webb, W.W. (1976). Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. *Biophys. J.* 16, 1055-1069.

Bleasdale, J.E., Thakur, N.R., Gremban, R.S., Bundy, G.L., Fitzpatrick, F.A., Smith, R.J., and Bunting, S. (1990). Selective inhibition of receptor-coupled phospholipase C-dependent processes in human platelets and polymorphonuclear neutrophils. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 255, 756-768.

Bolte, S., and Cordelieres, F.P. (2006). A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J. Microsc.* 224, 213-232.

Brass, A.L., Dykxhoorn, D.M., Benita, Y., Yan, N., Engelman, A., Xavier, R.J., Lieberman, J., and Elledge, S.J. (2008). Identification of host proteins required for HIV infection through a functional genomic screen. *Science* 319, 921-926.

Brown, M., Adyshev, D., Bindokas, V., Moitra, J., Garcia, J.G., and Dudek, S.M. (2010). Quantitative distribution and colocalization of non-muscle myosin light chain kinase isoforms and cortactin in human lung endothelium. *Microvasc. Res.* 80, 75-88.

Bruix, J., Raoul, J.L., Sherman, M., Mazzaferro, V., Bolondi, L., Craxi, A., Galle, P.R., Santoro, A., Beaugrand, M., Sangiovanni, A., *et al.* (2012). Efficacy and Safety of Sorafenib in Patients with Advanced Hepatocellular Carcinoma: Subanalyses of a Phase III Trial. *J. Hepatol.* 57, 821-829.

Casagrande, F., Bacqueville, D., Pillaire, M.J., Malecaze, F., Manenti, S., Breton-Douillon, M., and Darbon, J.M. (1998). G1 phase arrest by the phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor LY 294002 is correlated to up-regulation of p27Kip1 and inhibition of G1 CDKs in choroidal melanoma cells. *FEBS Lett.* 422, 385-390.

Davies, S.P., Reddy, H., Caivano, M., and Cohen, P. (2000). Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem. J.* 351, 95-105.

Dill, M.T., Makowska, Z., Duong, F.H., Merkofer, F., Filipowicz, M., Baumert, T.F., Tornillo, L., Terracciano, L., and Heim, M.H. (2012). Interferon-gamma-stimulated genes, but not USP18, are expressed in livers of patients with acute hepatitis C. *Gastroenterology* 143, 777-786.e771-776.

Duncia, J.V., Santella, J.B., 3rd, Higley, C.A., Pitts, W.J., Wityak, J., Fietze, W.E., Rankin, F.W., Sun, J.H., Earl, R.A., Tabaka, A.C., *et al.* (1998). MEK inhibitors: the

chemistry and biological activity of U0126, its analogs, and cyclization products. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **8**, 2839-2844.

Fofana, I., Fafi-Kremer, S., Carolla, P., Fauvelle, C., Zahid, M.N., Turek, M., Heydmann, L., Cury, K., Hayer, J., Combet, C., *et al.* (2012). Mutations that alter use of hepatitis C virus cell entry factors mediate escape from neutralizing antibodies. *Gastroenterology* **143**, 223-233 e229.

French, A.P., Mills, S., Swarup, R., Bennett, M.J., and Pridmore, T.P. (2008). Colocalization of fluorescent markers in confocal microscope images of plant cells. *Nat. Protoc.* **3**, 619-628.

Han, Z., Boyle, D.L., Chang, L., Bennett, B., Karin, M., Yang, L., Manning, A.M., and Firestein, G.S. (2001). c-Jun N-terminal kinase is required for metalloproteinase expression and joint destruction in inflammatory arthritis. *J. Clin. Invest.* **108**, 73-81.

Huang, D., Cheung, A.T., Parsons, J.T., and Bryer-Ash, M. (2002). Focal adhesion kinase (FAK) regulates insulin-stimulated glycogen synthesis in hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **277**, 18151-18160.

Krieger, S.E., Zeisel, M.B., Davis, C., Thumann, C., Harris, H.J., Schnober, E.K., Mee, C., Soulier, E., Royer, C., Lambotin, M., *et al.* (2010). Inhibition of hepatitis C virus infection by anti-claudin-1 antibodies is mediated by neutralization of E2-CD81-claudin-1 associations. *Hepatology* **51**, 1144-1157.

Lupberger, J., Mund, A., Kock, J., and Hildt, E. (2006). Cultivation of HepG2.2.15 on Cytodex-3: higher yield of hepatitis B virus and less subviral particles compared to conventional culture methods. *J. Hepatol.* **45**, 547-552.

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

Martiny-Baron, G., Kazanietz, M.G., Mischak, H., Blumberg, P.M., Kochs, G., Hug, H., Marme, D., and Schachtele, C. (1993). Selective inhibition of protein kinase C isozymes by the indolocarbazole Go 6976. *J. Biol. Chem.* **268**, 9194-9197.

Muller, J., Sperl, B., Reindl, W., Kiessling, A., and Berg, T. (2008). Discovery of chromone-based inhibitors of the transcription factor STAT5. *Chembiochem.* **9**, 723-727.

Nakae, J., Park, B.C., and Accili, D. (1999). Insulin stimulates phosphorylation of the forkhead transcription factor FKHR on serine 253 through a Wortmannin-sensitive pathway. *J. Biol. Chem.* **274**, 15982-15985.

Ohuri, M., Kinoshita, T., Okubo, M., Sato, K., Yamazaki, A., Arakawa, H., Nishimura, S., Inamura, N., Nakajima, H., Neya, M., *et al.* (2005). Identification of a selective ERK

inhibitor and structural determination of the inhibitor-ERK2 complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 336, 357-363.

Ong, S.E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D.B., Steen, H., Pandey, A., and Mann, M. (2002). Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* 1, 376-386.

Shepherd, F.A., Rodrigues Pereira, J., Ciuleanu, T., Tan, E.H., Hirsh, V., Thongprasert, S., Campos, D., Maoleekoonpiroj, S., Smylie, M., Martins, R., *et al.* (2005). Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* 353, 123-132.

Slack-Davis, J.K., Martin, K.H., Tilghman, R.W., Iwanicki, M., Ung, E.J., Autry, C., Luzzio, M.J., Cooper, B., Kath, J.C., Roberts, W.G., *et al.* (2007). Cellular characterization of a novel focal adhesion kinase inhibitor. *J. Biol. Chem.* 282, 14845-14852.

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

Xu, X., Kasembeli, M.M., Jiang, X., Tweardy, B.J., and Tweardy, D.J. (2009). Chemical probes that competitively and selectively inhibit Stat3 activation. *PLoS One* 4, e4783.

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

Zinchuk, V., Zinchuk, O., and Okada, T. (2007). Quantitative colocalization analysis of multicolor confocal immunofluorescence microscopy images: pushing pixels to explore biological phenomena. *Acta. Histochem. Cytochem.* 40, 101-111.



## **DISCUSSION ET CONCLUSION**

Plus de 20 ans après sa découverte, il est maintenant bien établi que le HCV est un agent pathogène humain majeur, infectant plus de 170 millions de personnes dans le monde, ce qui conduit à un problème de santé mondial nécessitant des interventions actives généralisées pour la prévention et le contrôle de l'infection par le HCV. En cas d'échappement du HCV à l'immunité au cours de l'infection aiguë, le virus peut persister dans le foie pendant de nombreuses années sans induire de maladie ou, au contraire, il peut provoquer des dommages cellulaires par le biais de cellules de l'immunité et aboutir à une fibrose, cirrhose ou à un HCC.

Aucun vaccin contre le HCV n'est disponible et les thérapies actuelles pour traiter le HCV sont basées sur une combinaison d'IFN et de ribavirine, ainsi que de nouvelles molécules antivirales (DAA) ciblant directement les protéines non-structurales du HCV (Lok et al., 2012). Dans environ 50% des cas, le patient ne sera pas guéri par le traitement. Ainsi, des médicaments spécifiques et efficaces pour combattre l'infection par le HCV sont attendus. Les inhibiteurs d'entrée (HTA) peuvent être particulièrement pertinents pour les personnes résistantes au traitement actuel ou qui subissent une transplantation du foie, car le blocage de l'infection du greffon sain est une priorité importante.

### **I. L'EGFR et l'EphA2 sont des co-facteurs d'entrée du HCV**

L'identification de RTK comme co-facteurs d'entrée du HCV étend nos connaissances sur les mécanismes moléculaires et cellulaires de conditions d'entrée du virus. La découverte de PKI comme antiviraux définit une stratégie potentielle nouvelle pour prévenir et traiter l'infection par le HCV.

Nous avons montré que les ligands de l'EGFR renforcent l'entrée et l'infection par le HCV, et un anticorps spécifique dirigé contre l'EGFR inhibe l'entrée et l'infection par le HCV. Cet anticorps se lie entre le domaine III de liaison du ligand et le début domaine IV de la partie extracellulaire de l'EGFR (Reiter and Maihle, 1996) et empêche l'EGF et le TGF- $\alpha$  d'induire la dimérisation et donc l'activation du récepteur (McCole et al., 2002). Ainsi, il est probable que la dimérisation du récepteur et / ou le domaine visé par cet anticorps sont nécessaires pour l'entrée du HCV. Des résultats similaires ont été obtenus pour EphA2, à savoir que des anticorps spécifiques dirigés contre le domaine extracellulaire d'EphA2 inhibent l'entrée du

HCV. Contrairement à l'EGFR, des ligands de substitution d'EphA2 diminuent l'entrée virale en entraînant la suppression de l'EphA2 de la membrane plasmique et sa dégradation. Comme ces ligands de substitution réduisent l'entrée du HCV seulement faiblement, il est concevable que l'effet d'EphA2 sur l'entrée du HCV puisse être à la fois dépendante et indépendante du ligand. Ceci est cohérent avec d'autres fonctions bien caractérisées d'EphA2, telles que l'invasion cellulaire et la migration (Miao et al., 2009).

Nos résultats mettent en lumière un rôle des RTK EGFR et EphA2 dans la formation du complexe de facteurs d'entrée du HCV et lors de la fusion membranaire, ce qui permet au virus d'entrer efficacement dans sa cellule cible. Par l'analyse de proximité moléculaire de CD81 et CLDN1 à la membrane, nous avons trouvé que l'inhibition de l'activité de l'EGFR ou de l'EphA2 réduit l'association de CD81-CLDN1 à la surface cellulaire. Comme l'activation de l'EGFR n'a pas été rapporté comme pouvant promouvoir une redistribution de CLDN1 (Flores-Benitez et al., 2009), nous émettons l'hypothèse que l'activation de l'EGFR module le trafic de CD81, qui est nécessaire à la formation du complexe de co-récepteurs CD81-CLDN1 avec l'enveloppe virale (Harris et al., 2010; Harris et al., 2008; Krieger et al., 2010).

Enfin, nos résultats ont des implications cliniques pour la prévention et le traitement de l'infection par le HCV, car ils montrent que des PKI cliniquement approuvés ont une activité antivirale *in vitro* et *in vivo* et qu'un anticorps spécifique de RTK inhibe l'entrée du virus. Ainsi, l'inhibition de la fonction des RTK, comme co-facteurs d'entrée du HCV, par des anticorps ou des PKI pourrait constituer une nouvelle approche pour la prévention et le traitement de l'infection par le HCV et adresser la résistance virale. En effet, cibler un facteur de l'hôte aurait le potentiel d'éviter la formation de virus résistants au traitement, car par rapport à la variabilité du virus, la variabilité génétique de l'hôte est faible. Ainsi, les HTA imposent une barrière génétique à la résistance très élevée (Zeisel et al., 2012). Comme les facteurs de l'hôte sont essentiels pour le cycle de vie du virus, les HTA sont caractérisées par une large activité pan-génomique, tandis que la première génération DAA ciblant le HCV sont caractérisés par une activité antivirale limitée au génotype 1 (Sarrazin et al., 2012). Enfin, en agissant par l'intermédiaire d'un mécanisme d'action complémentaire, les HTA peuvent agir de manière synergique avec le SOC. Cette synergie pourrait augmenter la barrière génétique à la résistance, raccourcir le temps de traitement et améliorer les effets secondaires en réduisant les doses des composés individuels (Zeisel et al., 2012). Le potentiel clinique de PKI de l'EGFR dans le traitement d'une hépatite C a été souligné dans un rapport récent décrivant une réponse virologique rapide après traitement en monothérapie avec de l'erlotinib chez un patient HCV

positif ayant un HCC, après greffe de foie (Bardou-Jacquet et al., 2011). Un essai clinique évaluant l'innocuité et la toxicité de l'erlotinib chez des patients chroniquement infectés par le HCV sera bientôt mené afin de mieux évaluer le potentiel des inhibiteurs de kinases comme médicaments anti-HCV en combinaison avec des DAA.

## **II. HRas régule la diffusion membranaire et la mobilité de CD81 et déclenche le ré-arrangement des TEM et la formation du complexe de facteurs d'entrée du HCV**

Nous avons identifié la GTPase HRas comme un facteur clé dans la signalisation lors de l'entrée du HCV. HRas s'associe avec le complexe de co-récepteur CD81-CLDN1, fournissant un lien physique entre la voie de signalisation EGFR/Shc1/Grb2/HRas et le complexe de facteur d'entrée du HCV. De plus, nous avons identifié les protéines associées à CD81 ITGB1 (intégrin beta 1) et Rap2B comme de nouveaux co-facteurs d'entrée du HCV. HRas régule l'association de CD81-CLDN1 et la diffusion et le confinement à la membrane plasmique de CD81. Comme la diffusion latérale de CD81 et son association avec CLDN1 sont essentielles pour l'entrée du HCV *in vitro* (Harris et al., 2012; Harris et al., 2010; Krieger et al., 2010), ces résultats identifient HRas comme un déclencheur clé de l'entrée du HCV.

La liaison du HCV avec CD81 peut induire les voies de signalisation des MAPK (Brazzoli et al., 2008) et de la PI3K/Akt (Liu et al., 2012). Par ailleurs, la fonction de l'EGFR est nécessaire pour l'entrée du HCV (Lupberger et al., 2011) et la liaison du HCV à CD81 favorise la phosphorylation de l'EGFR et donc son activation (Diao et al., 2012). Ces études suggèrent que le HCV peut utiliser plusieurs voies de signalisation et mécanismes cellulaires pour entrer dans sa cellule-cible. Nous avons étudié la signalisation cellulaire lors de l'entrée du HCV dans des cellules hépatiques et nos résultats démontrent un rôle pour la voie de signalisation HRas/MAPK lors de l'infection par le HCV d'hépatocytes humains et de tissu hépatique dérivé du patient. Nos analyses fonctionnelles suggèrent que HRas agit comme un interrupteur moléculaire favorisant l'entrée du HCV induite par les RTK et que l'entrée du HCV induite par l'EGFR est dépendante de la fonction de HRas.

Notre observation que HRas s'associe avec CD81 dans les TEM soutient nos données biochimiques montrant que HRas fait le lien entre la signalisation des RTK et CD81 et favorise l'association CD81-CLDN1. Ceci est en accord avec la découverte récente que l'internalisation de CD81 via un processus dépendant de la clathrine et de la dynamine est indépendant du

domaine cytoplasmique de CD81, suggérant un rôle pour les protéines partenaires associées à réguler le trafic de CD81 (Farquhar et al., 2012). De plus, il a été rapporté que l'engagement de CD81 permet d'activer des membres de la famille des GTPases Rho, menant à la relocalisation dépendante de l'actine du complexe HCV-E2/CD81 et à l'activation de la signalisation des MAPK (Brazzoli et al., 2008).

Les microdomaines membranaires, tels que les TEM ou les radeaux lipidiques, jouent un rôle dans une variété de processus physiologiques et pathologiques, par exemple en tant que plate-formes de signalisation (Le Naour et al., 2006). Les TEM et les radeaux lipidiques diffèrent par leur solubilité dans du Triton X 100 et aussi dans leur composition en protéines et sont donc des microdomaines distincts (Le Naour et al., 2006). HRas inactif lié au GDP est associé aux radeaux lipidiques (Prior et al., 2001) alors que HRas actif lié au GTP est séparé des radeaux lipidiques et il active la transduction de la voie Raf/MAPK (Prior et al., 2001). Ainsi, il est probable que des signaux induits par l'EGFR active la fonction de HRas et conduisent au ré-arrangement de TEM contenant CD81, ce qui entraînerait la formation du complexe de récepteur CD81-CLDN1.

Notre analyse fonctionnelle des protéines associées à HRas et CD81 dans les TEM démontre pour la première fois un rôle fonctionnel de la GTPase Rap2B et d'ITGB1 comme nouveaux co-facteurs pour l'entrée du HCV. Comme HRas, les GTPases Rap sont des régulateurs connus de la fonction des intégrines. Rap augmente l'avidité des intégrines en favorisant leur regroupement (Kinbara et al., 2003) qui pourrait avoir un impact important sur la formation des TEM. Les intégrines sont des protéines transmembranaires hétérodimériques composés d'une sous-unité alpha et bêta, qui couplent la matrice extracellulaire au cytosquelette d'actine (Stewart and Nemerow, 2007). Les changements de conformation des intégrines provoquent des événements de signalisation qui favorisent la réorganisation du cytosquelette et l'internalisation de nombreux virus, y compris les adénovirus, les hantavirus, les picornavirus et les réovirus (Stewart and Nemerow, 2007).

L'EGFR peut être activé sur les sites de contact de cellule à cellule d'une manière dépendante de ITGB1 (Moro et al., 1998) et des études récentes démontrent que ITGB1 contrôle la signalisation de l'EGFR (Morello et al., 2011) ce qui suggère un « crosstalk » entre ITGB1 et EGFR dans l'entrée du HCV. HRas agirait donc de concert avec Rap2B et ITGB1 pour former un complexe fonctionnel qui peut réguler la mobilité des récepteurs d'entrée, ainsi que l'organisation du cytosquelette membranaire. Nos résultats soulignent que les TEM sont des

zones actives et dynamiques de la membrane et mettent en avant un rôle important des GTPases comme des interrupteurs moléculaires fournissant un lien fonctionnel entre les tétraspanines associées aux TEM et le cytosquelette qui permet la formation efficace du complexe co-récepteur et l'entrée cellulaire du virus. En effet, les TEM ont été associés à l'initiation de l'infection par divers agents pathogènes y compris le HCV (Pileri et al., 1998). De plus, une étude récente a suggéré un rôle potentiel pour CD81 et HRas pour l'entrée du virus de la grippe (Karlas et al., 2010), bien que leur fonction exacte n'a pas été étudiée. Dans cette étude, nous démontrons que la diminution de l'expression de HRas inhibe l'entrée de pseudoparticules exprimant les glycoprotéines du virus de la grippe A et de la rougeole. Collectivement, ces résultats mettent en évidence une pertinence fonctionnelle pour HRas et son rôle dans la compartimentation membranaire et le trafic de récepteurs lors de l'entrée de virus d'autres familles. Par ailleurs, nos résultats mettent en évidence un nouveau mécanisme pour réguler l'invasion du foie dépendante de CD81 par des pathogènes, qui est aussi dépendante de HRas.

Enfin, nos résultats peuvent avoir des implications thérapeutiques pour le traitement des infections virales. Notre étude suggère que l'interférence pharmacologique avec HRas peut fournir une nouvelle perspective de lutte contre un large éventail d'infections virales comme l'hépatite C, la grippe et la rougeole. En effet, les HTA sont une nouvelle stratégie visant à surmonter la résistance aux antiviraux (Zeisel et al., 2012). Le développement récent de petites molécules autorisées en clinique dans le traitement du cancer, montrant une inhibition sûre et efficace des GTPase *in vivo* (Downward, 2003; Vanneman and Dranoff, 2012), offre une occasion unique de développer de nouvelles stratégies antivirales ciblant l'hôte. En conclusion, notre étude n'a pas seulement un impact important pour la compréhension de l'entrée du virus et la pathogenèse, mais aussi pour le développement de stratégies préventives et thérapeutiques antivirales.

### **III. Perspectives**

Nous avons montré que les RTK n'ont pas d'incidence sur les niveaux d'expression des facteurs entrée du HCV (SR-BI, CD81, CLDN1 et OCLN) dans des cellules d'hépatome (Lupberger et al., 2011), mais au contraire, ils modifient le trafic et la motilité de CD81 et favorise la formation du complexe CD81-CLDN1 (Zona et al., *Cell Host & Microbe*, soumis). EGFR et EphA2 modulent l'association de CD81 avec CLDN1, mais s'ils agissent de concert,

en synergie ou par l'intermédiaire de mécanismes indépendants sont des questions ouvertes. De plus, l'expression de l'EGFR et d'un de ses ligands (le TGF- $\alpha$ ) est élevée dans le carcinome hépatocellulaire et dans les cellules infectées par le HCV (Divella et al., 2012). L'impact de cette observation sur la progression de l'hépatite en cancer reste à définir.

Les virus utilisent les facteurs de l'hôte, comme l'EGFR, pour entrer dans la cellule et réaliser le cycle viral et la transmission à d'autres cellules. Cette utilisation et donc l'activation des voies de signalisation qui en découle peuvent conduire à des pathologies du foie comme une fibrose mais surtout un HCC. Nos résultats peuvent donc également avoir des répercussions sur la carcinogenèse virale. En effet, la signalisation dépendante des RTK par des facteurs de la cellule hôte comme le PDGFR (platelet-derived growth factor receptor) et EphA2 est importante lors de l'entrée cellulaire du hCMV et de l'herpès virus associé au sarcome de Kaposi (Hahn et al., 2012; Soroceanu et al., 2008), deux virus associés à la malignité chez les patients immunodéprimés. L'expression élevée d'EGFR chez les patients atteints d'hépatite chronique C suggèrent fortement une pertinence fonctionnelle des RTK et de leurs voies de signalisation dans la pathogenèse de la maladie hépatique liée au HCV. De plus, des études antérieures ont montré que l'expression de HRas est augmentée au cours des différentes étapes de l'hépatocarcinogenèse et BRaf est surexprimé dans les tissus du foie de HCC (Newell et al., 2009). Comme la voie Ras / Raf est impliquée dans le développement du cancer du foie (Newell et al., 2009), il est concevable que les interactions virus-hôte et la signalisation des RTK ne sont pas seulement impliquées dans la facilitation de l'entrée du virus dans la cellule, mais pourraient aussi contribuer à la carcinogenèse virale. D'autres études sont en cours pour répondre à cette question au sein du laboratoire.

## **BIBLIOGRAPHIE**

- Adams, R.H., and Klein, R. (2000). Eph receptors and ephrin ligands. essential mediators of vascular development. *Trends Cardiovasc Med* 10, 183-188.
- Agnello, V., Abel, G., Elfahal, M., Knight, G.B., and Zhang, Q.X. (1999). Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 12766-12771.
- Akazawa, D., Date, T., Morikawa, K., Murayama, A., Miyamoto, M., Kaga, M., Barth, H., Baumert, T.F., Dubuisson, J., and Wakita, T. (2007). CD81 expression is important for the permissiveness of Huh7 cell clones for heterogeneous hepatitis C virus infection. *J Virol* 81, 5036-5045.
- Akita, R.W., and Sliwkowski, M.X. (2003). Preclinical studies with Erlotinib (Tarceva). *Semin Oncol* 30, 15-24.
- Albecka, A., Belouzard, S., Op de Beeck, A., Descamps, V., Goueslain, L., Bertrand-Michel, J., Terce, F., Duverlie, G., Rouille, Y., and Dubuisson, J. (2012). Role of low-density lipoprotein receptor in the hepatitis C virus life cycle. *Hepatology* 55, 998-1007.
- Alter, H.J., Purcell, R.H., Holland, P.V., and Popper, H. (1978). Transmissible agent in non-A, non-B hepatitis. *Lancet* 1, 459-463.
- Alter, M.J. (2007). Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol* 13, 2436-2441.
- Alvisi, G., Madan, V., and Bartenschlager, R. (2011). Hepatitis C virus and host cell lipids: an intimate connection. *RNA Biol* 8, 258-269.
- Amado, R.G., Wolf, M., Peeters, M., Van Cutsem, E., Siena, S., Freeman, D.J., Juan, T., Sikorski, R., Suggs, S., Radinsky, R., *et al.* (2008). Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 26, 1626-1634.
- Amako, Y., Tsukiyama-Kohara, K., Katsume, A., Hirata, Y., Sekiguchi, S., Tobita, Y., Hayashi, Y., Hishima, T., Funata, N., Yonekawa, H., *et al.* (2010). Pathogenesis of hepatitis C virus infection in *Tupaia belangeri*. *J Virol* 84, 303-311.
- Andl, C.D., Mizushima, T., Oyama, K., Bowser, M., Nakagawa, H., and Rustgi, A.K. (2004). EGFR-induced cell migration is mediated predominantly by the JAK-STAT pathway in primary esophageal keratinocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287, G1227-1237.



- Andre, P., Komurian-Pradel, F., Deforges, S., Perret, M., Berland, J.L., Sodoyer, M., Pol, S., Brechot, C., Paranhos-Baccala, G., and Lotteau, V. (2002). Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles. *J Virol* 76, 6919-6928.
- Angelow, S., Ahlstrom, R., and Yu, A.S. (2008). Biology of claudins. *Am J Physiol Renal Physiol* 295, F867-876.
- Appel, N., Schaller, T., Penin, F., and Bartenschlager, R. (2006). From structure to function: new insights into hepatitis C virus RNA replication. *J Biol Chem* 281, 9833-9836.
- Appel, N., Zayas, M., Miller, S., Krijnse-Locker, J., Schaller, T., Friebe, P., Kallis, S., Engel, U., and Bartenschlager, R. (2008). Essential role of domain III of nonstructural protein 5A for hepatitis C virus infectious particle assembly. *PLoS Pathog* 4, e1000035.
- Arvanitis, D., and Davy, A. (2008). Eph/ephrin signaling: networks. *Genes Dev* 22, 416-429.
- Ashwell, J.D. (2006). The many paths to p38 mitogen-activated protein kinase activation in the immune system. *Nat Rev Immunol* 6, 532-540.
- Astier-Gin, T., Bellecave, P., Litvak, S., and Ventura, M. (2005). Template requirements and binding of hepatitis C virus NS5B polymerase during in vitro RNA synthesis from the 3'-end of virus minus-strand RNA. *FEBS J* 272, 3872-3886.
- Babitt, J., Trigatti, B., Rigotti, A., Smart, E.J., Anderson, R.G., Xu, S., and Krieger, M. (1997). Murine SR-BI, a high density lipoprotein receptor that mediates selective lipid uptake, is N-glycosylated and fatty acylated and colocalizes with plasma membrane caveolae. *J Biol Chem* 272, 13242-13249.
- Bamford, S., Dawson, E., Forbes, S., Clements, J., Pettett, R., Dogan, A., Flanagan, A., Teague, J., Futreal, P.A., Stratton, M.R., *et al.* (2004). The COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) database and website. *Br J Cancer* 91, 355-358.
- Bardou-Jacquet, E., Lorho, R., and Guyader, D. (2011). Kinase inhibitors in the treatment of chronic hepatitis C virus. *Gut* 60, 879-880.
- Baril, M., and Brakier-Gingras, L. (2005). Translation of the F protein of hepatitis C virus is initiated at a non-AUG codon in a +1 reading frame relative to the polyprotein. *Nucleic Acids Res* 33, 1474-1486.
- Bartenschlager, ed. (2013). *Current Topics in Microbiology and Immunology - Hepatitis C Virus: From Molecular Virology to Antiviral Therapy (Chapter 4)* (Springer).
- Bartenschlager, R., Frese, M., and Pietschmann, T. (2004). Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence. *Adv Virus Res* 63, 71-180.

- Bartenschlager, R., Penin, F., Lohmann, V., and Andre, P. (2011). Assembly of infectious hepatitis C virus particles. *Trends Microbiol* 19, 95-103.
- Barth, H., Cerino, R., Arcuri, M., Hoffmann, M., Schurmann, P., Adah, M.I., Gissler, B., Zhao, X., Ghisetti, V., Lavezzo, B., *et al.* (2005). Scavenger receptor class B type I and hepatitis C virus infection of primary tupaia hepatocytes. *J Virol* 79, 5774-5785.
- Barth, H., Robinet, E., Liang, T.J., and Baumert, T.F. (2008). Mouse models for the study of HCV infection and virus-host interactions. *J Hepatol* 49, 134-142.
- Barth, H., Schafer, C., Adah, M.I., Zhang, F., Linhardt, R.J., Toyoda, H., Kinoshita-Toyoda, A., Toida, T., Van Kuppevelt, T.H., Depla, E., *et al.* (2003). Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate. *J Biol Chem* 278, 41003-41012.
- Barth, H., Schnober, E.K., Zhang, F., Linhardt, R.J., Depla, E., Boson, B., Cosset, F.L., Patel, A.H., Blum, H.E., and Baumert, T.F. (2006). Viral and cellular determinants of the hepatitis C virus envelope-heparan sulfate interaction. *J Virol* 80, 10579-10590.
- Bartley, T.D., Hunt, R.W., Welcher, A.A., Boyle, W.J., Parker, V.P., Lindberg, R.A., Lu, H.S., Colombero, A.M., Elliott, R.L., Guthrie, B.A., *et al.* (1994). B61 is a ligand for the ECK receptor protein-tyrosine kinase. *Nature* 368, 558-560.
- Bartosch, B., Dubuisson, J., and Cosset, F.L. (2003a). Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J Exp Med* 197, 633-642.
- Bartosch, B., Verney, G., Dreux, M., Donot, P., Morice, Y., Penin, F., Pawlotsky, J.M., Lavillette, D., and Cosset, F.L. (2005). An interplay between hypervariable region 1 of the hepatitis C virus E2 glycoprotein, the scavenger receptor BI, and high-density lipoprotein promotes both enhancement of infection and protection against neutralizing antibodies. *J Virol* 79, 8217-8229.
- Bartosch, B., Vitelli, A., Granier, C., Goujon, C., Dubuisson, J., Pascale, S., Scarselli, E., Cortese, R., Nicosia, A., and Cosset, F.L. (2003b). Cell entry of hepatitis C virus requires a set of co-receptors that include the CD81 tetraspanin and the SR-B1 scavenger receptor. *J Biol Chem* 278, 41624-41630.
- Basu, A., Kanda, T., Beyene, A., Saito, K., Meyer, K., and Ray, R. (2007). Sulfated homologues of heparin inhibit hepatitis C virus entry into mammalian cells. *J Virol* 81, 3933-3941.
- Baumert, T.F., Ito, S., Wong, D.T., and Liang, T.J. (1998). Hepatitis C virus structural proteins assemble into viruslike particles in insect cells. *J Virol* 72, 3827-3836.
- Beckmann, M.P., Cerretti, D.P., Baum, P., Vanden Bos, T., James, L., Farrah, T., Kozlosky, C., Hollingsworth, T., Shilling, H., Maraskovsky, E., *et al.* (1994). Molecular characterization of a family of ligands for eph-related tyrosine kinase receptors. *EMBO J* 13, 3757-3762.

- Berli, R.R., and Hynes, N.E. (1996). Epidermal growth factor-related peptides activate distinct subsets of ErbB receptors and differ in their biological activities. *J Biol Chem* 271, 6071-6076.
- Benedicto, I., Molina-Jimenez, F., Barreiro, O., Maldonado-Rodriguez, A., Prieto, J., Moreno-Otero, R., Aldabe, R., Lopez-Cabrera, M., and Majano, P.L. (2008). Hepatitis C virus envelope components alter localization of hepatocyte tight junction-associated proteins and promote occludin retention in the endoplasmic reticulum. *Hepatology* 48, 1044-1053.
- Benedicto, I., Molina-Jimenez, F., Bartosch, B., Cosset, F.L., Lavillette, D., Prieto, J., Moreno-Otero, R., Valenzuela-Fernandez, A., Aldabe, R., Lopez-Cabrera, M., *et al.* (2009). Tight junction-associated protein occludin is required for a post-binding step in hepatitis C virus entry and infection. *J Virol*.
- Benga, W.J., Krieger, S.E., Dimitrova, M., Zeisel, M.B., Parnot, M., Lupberger, J., Hildt, E., Luo, G., McLauchlan, J., Baumert, T.F., *et al.* (2010). Apolipoprotein E interacts with hepatitis C virus nonstructural protein 5A and determines assembly of infectious particles. *Hepatology* 51, 43-53.
- Berditchevski, F. (2001). Complexes of tetraspanins with integrins: more than meets the eye. *J Cell Sci* 114, 4143-4151.
- Berger, K.L., Cooper, J.D., Heaton, N.S., Yoon, R., Oakland, T.E., Jordan, T.X., Mateu, G., Grakoui, A., and Randall, G. (2009). Roles for endocytic trafficking and phosphatidylinositol 4-kinase III alpha in hepatitis C virus replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 7577-7582.
- Berger, K.L., and Randall, G. (2009). Potential roles for cellular cofactors in hepatitis C virus replication complex formation. *Commun Integr Biol* 2, 471-473.
- Bissig, K.D., Wieland, S.F., Tran, P., Isogawa, M., Le, T.T., Chisari, F.V., and Verma, I.M. (2010). Human liver chimeric mice provide a model for hepatitis B and C virus infection and treatment. *J Clin Invest* 120, 924-930.
- Blanchard, E., Belouzard, S., Goueslain, L., Wakita, T., Dubuisson, J., Wychowski, C., and Rouille, Y. (2006). Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J Virol* 80, 6964-6972.
- Bleeker, W.K., Lammerts van Bueren, J.J., van Ojik, H.H., Gerritsen, A.F., Pluyter, M., Houtkamp, M., Halk, E., Goldstein, J., Schuurman, J., van Dijk, M.A., *et al.* (2004). Dual mode of action of a human anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody for cancer therapy. *J Immunol* 173, 4699-4707.
- Blight, K.J., McKeating, J.A., and Rice, C.M. (2002). Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* 76, 13001-13014.
- Bobardt, M., Hopkins, S., Baugh, J., Chatterji, U., Hernandez, F., Hiscott, J., Sluder, A., Lin, K., and Gallay, P.A. (2012). HCV NS5A and IRF9 compete for CypA binding. *J Hepatol*.

- Borowski, P., Schulze zur Wiesch, J., Resch, K., Feucht, H., Laufs, R., and Schmitz, H. (1999). Protein kinase C recognizes the protein kinase A-binding motif of nonstructural protein 3 of hepatitis C virus. *J Biol Chem* 274, 30722-30728.
- Boson, B., Granio, O., Bartenschlager, R., and Cosset, F.L. (2011). A concerted action of hepatitis C virus p7 and nonstructural protein 2 regulates core localization at the endoplasmic reticulum and virus assembly. *PLoS Pathog* 7, e1002144.
- Brantley-Sieders, D.M., Zhuang, G., Hicks, D., Fang, W.B., Hwang, Y., Cates, J.M., Coffman, K., Jackson, D., Bruckheimer, E., Muraoka-Cook, R.S., *et al.* (2008). The receptor tyrosine kinase EphA2 promotes mammary adenocarcinoma tumorigenesis and metastatic progression in mice by amplifying ErbB2 signaling. *J Clin Invest* 118, 64-78.
- Brazzoli, M., Bianchi, A., Filippini, S., Weiner, A., Zhu, Q., Pizza, M., and Crotta, S. (2008). CD81 is a central regulator of cellular events required for hepatitis C virus infection of human hepatocytes. *J Virol* 82, 8316-8329.
- Brenndorfer, E.D., Karthe, J., Frelin, L., Cebula, P., Erhardt, A., Schulte am Esch, J., Hengel, H., Bartenschlager, R., Sallberg, M., Haussinger, D., *et al.* (2009). Nonstructural 3/4A protease of hepatitis C virus activates epithelial growth factor-induced signal transduction by cleavage of the T-cell protein tyrosine phosphatase. *Hepatology* 49, 1810-1820.
- Bressanelli, S., Tomei, L., Roussel, A., Incitti, I., Vitale, R.L., Mathieu, M., De Francesco, R., and Rey, F.A. (1999). Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 13034-13039.
- Brimacombe, C.L., Grove, J., Meredith, L.W., Hu, K., Syder, A.J., Flores, M.V., Timpe, J.M., Krieger, S.E., Baumert, T.F., Tellinghuisen, T.L., *et al.* (2011). Neutralizing antibody-resistant hepatitis C virus cell-to-cell transmission. *J Virol* 85, 596-605.
- Brown, R.S. (2005). Hepatitis C and liver transplantation. *Nature* 436, 973-978.
- Bruckner, K., Pasquale, E.B., and Klein, R. (1997). Tyrosine phosphorylation of transmembrane ligands for Eph receptors. *Science* 275, 1640-1643.
- Bukh, J., Meuleman, P., Tellier, R., Engle, R.E., Feinstone, S.M., Eder, G., Satterfield, W.C., Govindarajan, S., Krawczynski, K., Miller, R.H., *et al.* (2010). Challenge pools of hepatitis C virus genotypes 1-6 prototype strains: replication fitness and pathogenicity in chimpanzees and human liver-chimeric mouse models. *J Infect Dis* 201, 1381-1389.
- Bukh, J., Miller, R.H., and Purcell, R.H. (1995). Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. *Semin Liver Dis* 15, 41-63.

- Burckstummer, T., Kriegs, M., Lupberger, J., Pauli, E.K., Schmittl, S., and Hildt, E. (2006). Raf-1 kinase associates with Hepatitis C virus NS5A and regulates viral replication. *FEBS Lett* 580, 575-580.
- Burlone, M.E., and Budkowska, A. (2009). Hepatitis C virus cell entry: role of lipoproteins and cellular receptors. *J Gen Virol* 90, 1055-1070.
- Burris, H.A., 3rd, Hurwitz, H.I., Dees, E.C., Dowlati, A., Blackwell, K.L., O'Neil, B., Marcom, P.K., Ellis, M.J., Overmoyer, B., Jones, S.F., *et al.* (2005). Phase I safety, pharmacokinetics, and clinical activity study of lapatinib (GW572016), a reversible dual inhibitor of epidermal growth factor receptor tyrosine kinases, in heavily pretreated patients with metastatic carcinomas. *J Clin Oncol* 23, 5305-5313.
- Butt, A.M., Feng, D., Nasrullah, I., Tahir, S., Idrees, M., Tong, Y., and Lu, J. (2012). Computational identification of interplay between phosphorylation and O-beta-glycosylation of human occludin as potential mechanism to impair hepatitis C virus entry. *Infect Genet Evol* 12, 1235-1245.
- Cai, L., Ji, A., de Beer, F.C., Tannock, L.R., and van der Westhuyzen, D.R. (2008). SR-BI protects against endotoxemia in mice through its roles in glucocorticoid production and hepatic clearance. *J Clin Invest* 118, 364-375.
- Cambi, A., Koopman, M., and Figdor, C.G. (2005). How C-type lectins detect pathogens. *Cell Microbiol* 7, 481-488.
- Cantley, L.C. (2002). The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296, 1655-1657.
- Carpenter, G., King, L., Jr., and Cohen, S. (1978). Epidermal growth factor stimulates phosphorylation in membrane preparations in vitro. *Nature* 276, 409-410.
- Carrere-Kremer, S., Montpellier-Pala, C., Cocquerel, L., Wychowski, C., Penin, F., and Dubuisson, J. (2002). Subcellular localization and topology of the p7 polypeptide of hepatitis C virus. *J Virol* 76, 3720-3730.
- Carroll, S.S., Ludmerer, S., Handt, L., Koeplinger, K., Zhang, N.R., Graham, D., Davies, M.E., MacCoss, M., Hazuda, D., and Olsen, D.B. (2009). Robust antiviral efficacy upon administration of a nucleoside analog to hepatitis C virus-infected chimpanzees. *Antimicrob Agents Chemother* 53, 926-934.
- Castet, V., Fournier, C., Soulier, A., Brillet, R., Coste, J., Larrey, D., Dhumeaux, D., Maurel, P., and Pawlotsky, J.M. (2002). Alpha interferon inhibits hepatitis C virus replication in primary human hepatocytes infected in vitro. *J Virol* 76, 8189-8199.

- Catanese, M.T., Ansuini, H., Graziani, R., Huby, T., Moreau, M., Ball, J.K., Paonessa, G., Rice, C.M., Cortese, R., Vitelli, A., *et al.* (2010). Role of scavenger receptor class B type I in hepatitis C virus entry: kinetics and molecular determinants. *J Virol* *84*, 34-43.
- Catanese, M.T., Graziani, R., von Hahn, T., Moreau, M., Huby, T., Paonessa, G., Santini, C., Luzzago, A., Rice, C.M., Cortese, R., *et al.* (2007). High-avidity monoclonal antibodies against the human scavenger class B type I receptor efficiently block hepatitis C virus infection in the presence of high-density lipoprotein. *J Virol* *81*, 8063-8071.
- Chang, K.S., Jiang, J., Cai, Z., and Luo, G. (2007). Human apolipoprotein e is required for infectivity and production of hepatitis C virus in cell culture. *J Virol* *81*, 13783-13793.
- Chang, L., and Karin, M. (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* *410*, 37-40.
- Charrin, S., Le Naour, F., Labas, V., Billard, M., Le Caer, J.P., Emile, J.F., Petit, M.A., Boucheix, C., and Rubinstein, E. (2003). EWI-2 is a new component of the tetraspanin web in hepatocytes and lymphoid cells. *Biochem J* *373*, 409-421.
- Choo, Q.L., Kuo, G., Weiner, A.J., Overby, L.R., Bradley, D.W., and Houghton, M. (1989). Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* *244*, 359-362.
- Citri, A., Skaria, K.B., and Yarden, Y. (2003). The deaf and the dumb: the biology of ErbB-2 and ErbB-3. *Exp Cell Res* *284*, 54-65.
- Citri, A., and Yarden, Y. (2006). EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol* *7*, 505-516.
- Cocquerel, L., Op de Beeck, A., Lambot, M., Roussel, J., Delgrange, D., Pillez, A., Wychowski, C., Penin, F., and Dubuisson, J. (2002). Topological changes in the transmembrane domains of hepatitis C virus envelope glycoproteins. *EMBO J* *21*, 2893-2902.
- Cocquerel, L., Voisset, C., and Dubuisson, J. (2006). Hepatitis C virus entry: potential receptors and their biological functions. *J Gen Virol* *87*, 1075-1084.
- Cocquerel, L., Wychowski, C., Minner, F., Penin, F., and Dubuisson, J. (2000). Charged residues in the transmembrane domains of hepatitis C virus glycoproteins play a major role in the processing, subcellular localization, and assembly of these envelope proteins. *J Virol* *74*, 3623-3633.
- Codran, A., Royer, C., Jaeck, D., Bastien-Valle, M., Baumert, T.F., Kieny, M.P., Pereira, C.A., and Martin, J.P. (2006). Entry of hepatitis C virus pseudotypes into primary human hepatocytes by clathrin-dependent endocytosis. *J Gen Virol* *87*, 2583-2593.

- Cohen, S., and Carpenter, G. (1975). Human epidermal growth factor: isolation and chemical and biological properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 1317-1321.
- Cormier, E.G., Durso, R.J., Tsamis, F., Boussemart, L., Manix, C., Olson, W.C., Gardner, J.P., and Dragic, T. (2004). L-SIGN (CD209L) and DC-SIGN (CD209) mediate transinfection of liver cells by hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 14067-14072.
- Cox, A.L., Mosbrugger, T., Mao, Q., Liu, Z., Wang, X.H., Yang, H.C., Sidney, J., Sette, A., Pardoll, D., Thomas, D.L., *et al.* (2005). Cellular immune selection with hepatitis C virus persistence in humans. *J Exp Med* 201, 1741-1752.
- Da Costa, D., Turek, M., Felmler, D.J., Girardi, E., Pfeffer, S., Long, G., Bartenschlager, R., Zeisel, M.B., and Baumert, T.F. (2012). Reconstitution of the entire hepatitis C virus life cycle in nonhepatic cells. *J Virol* 86, 11919-11925.
- Dao Thi, V.L., Granier, C., Zeisel, M.B., Guerin, M., Mancip, J., Granio, O., Penin, F., Lavillette, D., Bartenschlager, R., Baumert, T.F., *et al.* (2012). Characterization of hepatitis C virus particle sub-populations reveals multiple usage of the scavenger receptor BI for entry steps. *J Biol Chem*.
- Darnell, J.E., Jr. (1997). STATs and gene regulation. *Science* 277, 1630-1635.
- Davis, H.R., Jr., Zhu, L.J., Hoos, L.M., Tetzloff, G., Maguire, M., Liu, J., Yao, X., Iyer, S.P., Lam, M.H., Lund, E.G., *et al.* (2004). Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) is the intestinal phytosterol and cholesterol transporter and a key modulator of whole-body cholesterol homeostasis. *J Biol Chem* 279, 33586-33592.
- Davis, R.J. (2000). Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 103, 239-252.
- Davis, S., Gale, N.W., Aldrich, T.H., Maisonpierre, P.C., Lhotak, V., Pawson, T., Goldfarb, M., and Yancopoulos, G.D. (1994). Ligands for EPH-related receptor tyrosine kinases that require membrane attachment or clustering for activity. *Science* 266, 816-819.
- Dentzer, T.G., Lorenz, I.C., Evans, M.J., and Rice, C.M. (2009). Determinants of the hepatitis C virus nonstructural protein 2 protease domain required for production of infectious virus. *J Virol* 83, 12702-12713.
- Diao, J., Pantua, H., Ngu, H., Komuves, L., Diehl, L., Schaefer, G., and Kapadia, S.B. (2012). Hepatitis C virus induces epidermal growth factor receptor activation via CD81 binding for viral internalization and entry. *J Virol* 86, 10935-10949.
- Diaz, O., Delers, F., Maynard, M., Demignot, S., Zoulim, F., Chambaz, J., Trepo, C., Lotteau, V., and Andre, P. (2006). Preferential association of Hepatitis C virus with apolipoprotein B48-containing lipoproteins. *J Gen Virol* 87, 2983-2991.



- Dittmann, K., Mayer, C., Fehrenbacher, B., Schaller, M., Raju, U., Milas, L., Chen, D.J., Kehlbach, R., and Rodemann, H.P. (2005). Radiation-induced epidermal growth factor receptor nuclear import is linked to activation of DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 280, 31182-31189.
- Divella, R., Daniele, A., Gadaleta, C., Tufaro, A., Venneri, M.T., Paradiso, A., and Quaranta, M. (2012). Circulating transforming growth factor-beta and epidermal growth factor receptor as related to virus infection in liver carcinogenesis. *Anticancer Res* 32, 141-145.
- Dodelet, V.C., and Pasquale, E.B. (2000). Eph receptors and ephrin ligands: embryogenesis to tumorigenesis. *Oncogene* 19, 5614-5619.
- Dorner, M., Horwitz, J.A., Robbins, J.B., Barry, W.T., Feng, Q., Mu, K., Jones, C.T., Schoggins, J.W., Catanese, M.T., Burton, D.R., *et al.* (2011). A genetically humanized mouse model for hepatitis C virus infection. *Nature* 474, 208-211.
- Dorner, M., Rice, C.M., and Ploss, A. (2012). Study of hepatitis C virus entry in genetically humanized mice. *Methods*.
- Downward, J. (2003). Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3, 11-22.
- Dreux, M., Dao Thi, V.L., Fresquet, J., Guerin, M., Julia, Z., Verney, G., Durantel, D., Zoulim, F., Lavillette, D., Cosset, F.L., *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, e1000310.
- Dreux, M., Pietschmann, T., Granier, C., Voisset, C., Ricard-Blum, S., Mangeot, P.E., Keck, Z., Fong, S., Vu-Dac, N., Dubuisson, J., *et al.* (2006). High density lipoprotein inhibits hepatitis C virus-neutralizing antibodies by stimulating cell entry via activation of the scavenger receptor BI. *J Biol Chem* 281, 18285-18295.
- Dubuisson, J., Helle, F., and Cocquerel, L. (2008). Early steps of the hepatitis C virus life cycle. *Cell Microbiol* 10, 821-827.
- Dunn, E.F., and Connor, J.H. (2012). HijAkt: The PI3K/Akt pathway in virus replication and pathogenesis. *Prog Mol Biol Transl Sci* 106, 223-250.
- El Abd, Y.S., Tabll, A.A., El Din, N.G., Hosny Ael, D., Moustafa, R.I., El-Shenawy, R., Atef, K., and El-Awady, M.K. (2011). Neutralizing activities of caprine antibodies towards conserved regions of the HCV envelope glycoprotein E2. *Virol J* 8, 391.

- Elmowalid, G.A., Qiao, M., Jeong, S.H., Borg, B.B., Baumert, T.F., Sapp, R.K., Hu, Z., Murthy, K., and Liang, T.J. (2007). Immunization with hepatitis C virus-like particles results in control of hepatitis C virus infection in chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 8427-8432.
- Esko, J.D., and Lindahl, U. (2001). Molecular diversity of heparan sulfate. *J Clin Invest* 108, 169-173.
- Evans, M.J., Rice, C.M., and Goff, S.P. (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, 13038-13043.
- Evans, M.J., von Hahn, T., Tscherne, D.M., Syder, A.J., Panis, M., Wolk, B., Hatzioannou, T., McKeating, J.A., Bieniasz, P.D., and Rice, C.M. (2007). Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* 446, 801-805.
- Everett, R.S., Vanhook, M.K., Barozzi, N., Toth, I., and Johnson, L.G. (2006). Specific modulation of airway epithelial tight junctions by apical application of an occludin peptide. *Mol Pharmacol* 69, 492-500.
- Faila, C., Tomei, L., and De Francesco, R. (1994). Both NS3 and NS4A are required for proteolytic processing of hepatitis C virus nonstructural proteins. *J Virol* 68, 3753-3760.
- Farci, P., and Purcell, R.H. (2000). Clinical significance of hepatitis C virus genotypes and quasispecies. *Semin Liver Dis* 20, 103-126.
- Farquhar, M.J., Harris, H.J., Diskar, M., Jones, S., Mee, C.J., Nielsen, S.U., Brimacombe, C.L., Molina, S., Toms, G.L., Maurel, P., *et al.* (2008). Protein kinase A-dependent step(s) in hepatitis C virus entry and infectivity. *J Virol* 82, 8797-8811.
- Farquhar, M.J., Hu, K., Harris, H.J., Davis, C., Brimacombe, C.L., Fletcher, S.J., Baumert, T.F., Rappoport, J.Z., Balfe, P., and McKeating, J.A. (2012). Hepatitis C virus induces CD81 and claudin-1 endocytosis. *J Virol* 86, 4305-4316.
- Fayard, E., Tintignac, L.A., Baudry, A., and Hemmings, B.A. (2005). Protein kinase B/Akt at a glance. *J Cell Sci* 118, 5675-5678.
- Feldman, G.J., Mullin, J.M., and Ryan, M.P. (2005). Occludin: structure, function and regulation. *Adv Drug Deliv Rev* 57, 883-917.
- Ferguson, K.M. (2008). Structure-based view of epidermal growth factor receptor regulation. *Annu Rev Biophys* 37, 353-373.
- Fiorucci, M., Boulant, S., Fournillier, A., Abraham, J.D., Lavergne, J.P., Paranhos-Baccala, G., Inchauspe, G., and Bain, C. (2007). Expression of the alternative reading frame protein of Hepatitis C virus induces cytokines involved in hepatic injuries. *J Gen Virol* 88, 1149-1162.

- Flanagan, J.G., and Vanderhaeghen, P. (1998). The ephrins and Eph receptors in neural development. *Annu Rev Neurosci* 21, 309-345.
- Flint, M., Dubuisson, J., Maidens, C., Harrop, R., Guile, G.R., Borrow, P., and McKeating, J.A. (2000). Functional characterization of intracellular and secreted forms of a truncated hepatitis C virus E2 glycoprotein. *J Virol* 74, 702-709.
- Flisiak, R., Feinman, S.V., Jablkowski, M., Horban, A., Kryczka, W., Pawlowska, M., Heathcote, J.E., Mazzella, G., Vandelli, C., Nicolas-Metral, V., *et al.* (2009). The cyclophilin inhibitor Debio 025 combined with PEG IFNalpha2a significantly reduces viral load in treatment-naive hepatitis C patients. *Hepatology* 49, 1460-1468.
- Flores-Benitez, D., Rincon-Heredia, R., Razgado, L.F., Larre, I., Cereijido, M., and Contreras, R.G. (2009). Control of tight junctional sealing: roles of epidermal growth factor and prostaglandin E2. *Am J Physiol Cell Physiol* 297, C611-620.
- Fofana, I., Krieger, S.E., Grunert, F., Glaben, S., Xiao, F., Fafi-Kremer, S., Soulier, E., Royer, C., Thumann, C., Mee, C.J., *et al.* (2010). Monoclonal anti-claudin 1 antibodies prevent hepatitis C virus infection of primary human hepatocytes. *Gastroenterology* 139, 953-964, 964 e951-954.
- Forns, X., Thimme, R., Govindarajan, S., Emerson, S.U., Purcell, R.H., Chisari, F.V., and Bukh, J. (2000). Hepatitis C virus lacking the hypervariable region 1 of the second envelope protein is infectious and causes acute resolving or persistent infection in chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 13318-13323.
- French, A.R., Tadaki, D.K., Niyogi, S.K., and Lauffenburger, D.A. (1995). Intracellular trafficking of epidermal growth factor family ligands is directly influenced by the pH sensitivity of the receptor/ligand interaction. *J Biol Chem* 270, 4334-4340.
- Friebe, P., and Bartenschlager, R. (2002). Genetic analysis of sequences in the 3' nontranslated region of hepatitis C virus that are important for RNA replication. *J Virol* 76, 5326-5338.
- Friebe, P., Lohmann, V., Krieger, N., and Bartenschlager, R. (2001). Sequences in the 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication. *J Virol* 75, 12047-12057.
- Fried, M.W., Shiffman, M.L., Reddy, K.R., Smith, C., Marinos, G., Goncales, F.L., Jr., Haussinger, D., Diago, M., Carosi, G., Dhumeaux, D., *et al.* (2002). Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 347, 975-982.
- Fujita, J., Yoshida, O., Yuasa, Y., Rhim, J.S., Hatanaka, M., and Aaronson, S.A. (1984). Ha-ras oncogenes are activated by somatic alterations in human urinary tract tumours. *Nature* 309, 464-466.

- Fukuda, K., Tsuchihara, K., Hijikata, M., Nishiguchi, S., Kuroki, T., and Shimotohno, K. (2001). Hepatitis C virus core protein enhances the activation of the transcription factor, Elk1, in response to mitogenic stimuli. *Hepatology* 33, 159-165.
- Gale, M.J., Jr., Korth, M.J., Tang, N.M., Tan, S.L., Hopkins, D.A., Dever, T.E., Polyak, S.J., Gretch, D.R., and Katze, M.G. (1997). Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein. *Virology* 230, 217-227.
- Gao, L., Aizaki, H., He, J.W., and Lai, M.M. (2004). Interactions between viral nonstructural proteins and host protein hVAP-33 mediate the formation of hepatitis C virus RNA replication complex on lipid raft. *J Virol* 78, 3480-3488.
- Gao, M., Nettles, R.E., Belema, M., Snyder, L.B., Nguyen, V.N., Fridell, R.A., Serrano-Wu, M.H., Langley, D.R., Sun, J.H., O'Boyle, D.R., 2nd, *et al.* (2010). Chemical genetics strategy identifies an HCV NS5A inhibitor with a potent clinical effect. *Nature* 465, 96-100.
- Gastaminza, P., Cheng, G., Wieland, S., Zhong, J., Liao, W., and Chisari, F.V. (2008). Cellular determinants of hepatitis C virus assembly, maturation, degradation, and secretion. *J Virol* 82, 2120-2129.
- Georgel, P., Schuster, C., Zeisel, M.B., Stoll-Keller, F., Berg, T., Bahram, S., and Baumert, T.F. (2010). Virus-host interactions in hepatitis C virus infection: implications for molecular pathogenesis and antiviral strategies. *Trends Mol Med* 16, 277-286.
- Georgopoulou, U., Caravokiri, K., and Mavromara, P. (2003). Suppression of the ERK1/2 signaling pathway from HCV NS5A protein expressed by herpes simplex recombinant viruses. *Arch Virol* 148, 237-251.
- Germi, R., Crance, J.M., Garin, D., Guimet, J., Lortat-Jacob, H., Ruigrok, R.W., Zarski, J.P., and Drouet, E. (2002a). Cellular glycosaminoglycans and low density lipoprotein receptor are involved in hepatitis C virus adsorption. *J Med Virol* 68, 206-215.
- Germi, R., Crance, J.M., Garin, D., Guimet, J., Lortat-Jacob, H., Ruigrok, R.W., Zarski, J.P., and Drouet, E. (2002b). Heparan sulfate-mediated binding of infectious dengue virus type 2 and yellow fever virus. *Virology* 292, 162-168.
- Giambartolomei, S., Covone, F., Levrero, M., and Balsano, C. (2001). Sustained activation of the Raf/MEK/Erk pathway in response to EGF in stable cell lines expressing the Hepatitis C Virus (HCV) core protein. *Oncogene* 20, 2606-2610.

- Gosert, R., Egger, D., Lohmann, V., Bartenschlager, R., Blum, H.E., Bienz, K., and Moradpour, D. (2003). Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons. *J Virol* 77, 5487-5492.
- Gottwein, J.M., Scheel, T.K., Jensen, T.B., Ghanem, L., and Bukh, J. (2011). Differential efficacy of protease inhibitors against HCV genotypes 2a, 3a, 5a, and 6a NS3/4A protease recombinant viruses. *Gastroenterology* 141, 1067-1079.
- Gouklani, H., Bull, R.A., Beyer, C., Coulibaly, F., Gowans, E.J., Drummer, H.E., Netter, H.J., White, P.A., and Haqshenas, G. (2012). Hepatitis C virus nonstructural protein 5B is involved in virus morphogenesis. *J Virol* 86, 5080-5088.
- Grakoui, A., Wychowski, C., Lin, C., Feinstone, S.M., and Rice, C.M. (1993). Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products. *J Virol* 67, 1385-1395.
- Grebely, J., Matthews, G.V., and Dore, G.J. (2011). Treatment of acute HCV infection. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 8, 265-274.
- Gretton, S.N., Taylor, A.I., and McLauchlan, J. (2005). Mobility of the hepatitis C virus NS4B protein on the endoplasmic reticulum membrane and membrane-associated foci. *J Gen Virol* 86, 1415-1421.
- Griffin, S., Stgelais, C., Owsianka, A.M., Patel, A.H., Rowlands, D., and Harris, M. (2008). Genotype-dependent sensitivity of hepatitis C virus to inhibitors of the p7 ion channel. *Hepatology* 48, 1779-1790.
- Haberstroh, A., Schnober, E.K., Zeisel, M.B., Carolla, P., Barth, H., Blum, H.E., Cosset, F.L., Koutsoudakis, G., Bartenschlager, R., Union, A., *et al.* (2008). Neutralizing host responses in hepatitis C virus infection target viral entry at postbinding steps and membrane fusion. *Gastroenterology* 135, 1719-1728 e1711.
- Hahn, A.S., Kaufmann, J.K., Wies, E., Naschberger, E., Panteleev-Ivlev, J., Schmidt, K., Holzer, A., Schmidt, M., Chen, J., Konig, S., *et al.* (2012). The ephrin receptor tyrosine kinase A2 is a cellular receptor for Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Nat Med* 18, 961-966.
- Haid, S., Pietschmann, T., and Pecheur, E.I. (2009). Low pH-dependent hepatitis C virus membrane fusion depends on E2 integrity, target lipid composition, and density of virus particles. *J Biol Chem* 284, 17657-17667.
- Haid, S., Windisch, M.P., Bartenschlager, R., and Pietschmann, T. (2010). Mouse-specific residues of claudin-1 limit hepatitis C virus genotype 2a infection in a human hepatocyte cell line. *J Virol* 84, 964-975.

- Hallberg, B., Rayter, S.I., and Downward, J. (1994). Interaction of Ras and Raf in intact mammalian cells upon extracellular stimulation. *J Biol Chem* 269, 3913-3916.
- Han, J., Lee, J.D., Bibbs, L., and Ulevitch, R.J. (1994). A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* 265, 808-811.
- Han, J., and Sun, P. (2007). The pathways to tumor suppression via route p38. *Trends Biochem Sci* 32, 364-371.
- Harris, H.J., Clerte, C., Farquhar, M.J., Goodall, M., Hu, K., Rassam, P., Dosset, P., Wilson, G.K., Balfe, P., Ijzendoorn, S.C., *et al.* (2012). Hepatoma polarization limits CD81 and hepatitis C virus dynamics. *Cell Microbiol.*
- Harris, H.J., Davis, C., Mullins, J.G., Hu, K., Goodall, M., Farquhar, M.J., Mee, C.J., McCaffrey, K., Young, S., Drummer, H., *et al.* (2010). Claudin association with CD81 defines hepatitis C virus entry. *J Biol Chem* 285, 21092-21102.
- Harris, H.J., Farquhar, M.J., Mee, C.J., Davis, C., Reynolds, G.M., Jennings, A., Hu, K., Yuan, F., Deng, H., Hubscher, S.G., *et al.* (2008). CD81 and claudin 1 coreceptor association: role in hepatitis C virus entry. *J Virol* 82, 5007-5020.
- Harris, R.C., Chung, E., and Coffey, R.J. (2003). EGF receptor ligands. *Exp Cell Res* 284, 2-13.
- Hatzakis, A., Wait, S., Bruix, J., Buti, M., Carballo, M., Cavaleri, M., Colombo, M., Delarocque-Astagneau, E., Dusheiko, G., Esmat, G., *et al.* (2011). The state of hepatitis B and C in Europe: report from the hepatitis B and C summit conference\*. *J Viral Hepat* 18 Suppl 1, 1-16.
- Hayashi, J., Aoki, H., Kajino, K., Moriyama, M., Arakawa, Y., and Hino, O. (2000). Hepatitis C virus core protein activates the MAPK/ERK cascade synergistically with tumor promoter TPA, but not with epidermal growth factor or transforming growth factor alpha. *Hepatology* 32, 958-961.
- He, Y., Nakao, H., Tan, S.L., Polyak, S.J., Neddermann, P., Vijaysri, S., Jacobs, B.L., and Katze, M.G. (2002). Subversion of cell signaling pathways by hepatitis C virus nonstructural 5A protein via interaction with Grb2 and P85 phosphatidylinositol 3-kinase. *J Virol* 76, 9207-9217.
- Helle, F., and Dubuisson, J. (2008). Hepatitis C virus entry into host cells. *Cell Mol Life Sci* 65, 100-112.
- Henke, J.I., Goergen, D., Zheng, J., Song, Y., Schuttler, C.G., Fehr, C., Junemann, C., and Niepmann, M. (2008). microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *EMBO J* 27, 3300-3310.
- Heo, T.H., Lee, S.M., Bartosch, B., Cosset, F.L., and Kang, C.Y. (2006). Hepatitis C virus E2 links soluble human CD81 and SR-B1 protein. *Virus Res* 121, 58-64.

- Hezode, C., Forestier, N., Dusheiko, G., Ferenci, P., Pol, S., Goeser, T., Bronowicki, J.P., Bourliere, M., Gharakhanian, S., Bengtsson, L., *et al.* (2009). Telaprevir and peginterferon with or without ribavirin for chronic HCV infection. *N Engl J Med* 360, 1839-1850.
- Himanen, J.P., Saha, N., and Nikolov, D.B. (2007). Cell-cell signaling via Eph receptors and ephrins. *Curr Opin Cell Biol* 19, 534-542.
- Himanen, J.P., Yermekbayeva, L., Janes, P.W., Walker, J.R., Xu, K., Atapattu, L., Rajashankar, K.R., Mensinga, A., Lackmann, M., Nikolov, D.B., *et al.* (2010). Architecture of Eph receptor clusters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 10860-10865.
- Hirai, H., Maru, Y., Hagiwara, K., Nishida, J., and Takaku, F. (1987). A novel putative tyrosine kinase receptor encoded by the eph gene. *Science* 238, 1717-1720.
- Hiroishi, K., Ito, T., and Imawari, M. (2008). Immune responses in hepatitis C virus infection and mechanisms of hepatitis C virus persistence. *J Gastroenterol Hepatol* 23, 1473-1482.
- Hishiki, T., Shimizu, Y., Tobita, R., Sugiyama, K., Ogawa, K., Funami, K., Ohsaki, Y., Fujimoto, T., Takaku, H., Wakita, T., *et al.* (2010). Infectivity of hepatitis C virus is influenced by association with apolipoprotein E isoforms. *J Virol* 84, 12048-12057.
- Hoeller, D., Volarevic, S., and Dikic, I. (2005). Compartmentalization of growth factor receptor signalling. *Curr Opin Cell Biol* 17, 107-111.
- Hollinger, F.B., Gitnick, G.L., Aach, R.D., Szmunes, W., Mosley, J.W., Stevens, C.E., Peters, R.L., Weiner, J.M., Werch, J.B., and Lander, J.J. (1978). Non-A, non-B hepatitis transmission in chimpanzees: a project of the transfusion-transmitted viruses study group. *Intervirology* 10, 60-68.
- Holzman, L.B., Marks, R.M., and Dixit, V.M. (1990). A novel immediate-early response gene of endothelium is induced by cytokines and encodes a secreted protein. *Mol Cell Biol* 10, 5830-5838.
- Honda, M., Kaneko, S., Sakai, A., Unoura, M., Murakami, S., and Kobayashi, K. (1994). Degree of diversity of hepatitis C virus quasispecies and progression of liver disease. *Hepatology* 20, 1144-1151.
- Hopkins, S., DiMassimo, B., Rusnak, P., Heuman, D., Lalezari, J., Sluder, A., Scorneaux, B., Mosier, S., Kowalczyk, P., Ribeill, Y., *et al.* (2012). The cyclophilin inhibitor SCY-635 suppresses viral replication and induces endogenous interferons in patients with chronic HCV genotype 1 infection. *J Hepatol* 57, 47-54.
- Hsu, M., Zhang, J., Flint, M., Logvinoff, C., Cheng-Mayer, C., Rice, C.M., and McKeating, J.A. (2003). Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 7271-7276.



- Huang, F., and Sorkin, A. (2005). Growth factor receptor binding protein 2-mediated recruitment of the RING domain of Cbl to the epidermal growth factor receptor is essential and sufficient to support receptor endocytosis. *Mol Biol Cell* 16, 1268-1281.
- Huang, H., Sun, F., Owen, D.M., Li, W., Chen, Y., Gale, M., Jr., and Ye, J. (2007). Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 5848-5853.
- Hugle, T., Fehrmann, F., Bieck, E., Kohara, M., Krausslich, H.G., Rice, C.M., Blum, H.E., and Moradpour, D. (2001). The hepatitis C virus nonstructural protein 4B is an integral endoplasmic reticulum membrane protein. *Virology* 284, 70-81.
- Hui, L., Bakiri, L., Stepniak, E., and Wagner, E.F. (2007). p38alpha: a suppressor of cell proliferation and tumorigenesis. *Cell Cycle* 6, 2429-2433.
- Hynes, N.E., and Lane, H.A. (2005). ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer* 5, 341-354.
- Ishizawa, R., and Parsons, S.J. (2004). c-Src and cooperating partners in human cancer. *Cancer Cell* 6, 209-214.
- Janssen, H.L., Reesink, H.W., Zeuzem, S., Lawitz, E., Rodriguez-Torres, M., and Chen, A. (2011). A randomized, double-blind, placebo (plb) controlled safety and anti-viral proof-of concept study of miravirsin (mir), an oligonucleotide targeting miR122, in treatment of naive patients with genotype 1 (gt1) in chronic HCV infection. *Hepatology* 54.
- Jhaveri, R., Qiang, G., and Diehl, A.M. (2009). Domain 3 of hepatitis C virus core protein is sufficient for intracellular lipid accumulation. *J Infect Dis* 200, 1781-1788.
- Jiang, J., Cun, W., Wu, X., Shi, Q., Tang, H., and Luo, G. (2012). Hepatitis C Virus Attachment Mediated by Apolipoprotein E Binding to Cell Surface Heparan Sulfate. *J Virol*.
- Jiang, J., and Luo, G. (2009). Apolipoprotein E but not B is required for the formation of infectious hepatitis C virus particles. *J Virol* 83, 12680-12691.
- Jiang, X., Huang, F., Marusyk, A., and Sorkin, A. (2003). Grb2 regulates internalization of EGF receptors through clathrin-coated pits. *Mol Biol Cell* 14, 858-870.
- Jirasko, V., Montserret, R., Appel, N., Janvier, A., Eustachi, L., Brohm, C., Steinmann, E., Pietschmann, T., Penin, F., and Bartenschlager, R. (2008). Structural and functional characterization of nonstructural protein 2 for its role in hepatitis C virus assembly. *J Biol Chem* 283, 28546-28562.

- Jirasko, V., Montserret, R., Lee, J.Y., Gouttenoire, J., Moradpour, D., Penin, F., and Bartenschlager, R. (2010). Structural and functional studies of nonstructural protein 2 of the hepatitis C virus reveal its key role as organizer of virion assembly. *PLoS Pathog* 6, e1001233.
- Johnson, G.L., and Lapadat, R. (2002). Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298, 1911-1912.
- Jones, C.T., Catanese, M.T., Law, L.M., Khetani, S.R., Syder, A.J., Ploss, A., Oh, T.S., Schoggins, J.W., MacDonald, M.R., Bhatia, S.N., *et al.* (2010). Real-time imaging of hepatitis C virus infection using a fluorescent cell-based reporter system. *Nat Biotechnol* 28, 167-171.
- Jones, C.T., Murray, C.L., Eastman, D.K., Tassello, J., and Rice, C.M. (2007). Hepatitis C virus p7 and NS2 proteins are essential for production of infectious virus. *J Virol* 81, 8374-8383.
- Jopling, C.L., Yi, M., Lancaster, A.M., Lemon, S.M., and Sarnow, P. (2005). Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science* 309, 1577-1581.
- Kachko, A., Kochneva, G., Sivolobova, G., Grazhdantseva, A., Lupan, T., Zubkova, I., Wells, F., Merchlinsky, M., Williams, O., Watanabe, H., *et al.* (2011). New neutralizing antibody epitopes in hepatitis C virus envelope glycoproteins are revealed by dissecting peptide recognition profiles. *Vaccine* 30, 69-77.
- Kaito, M., Watanabe, S., Tsukiyama-Kohara, K., Yamaguchi, K., Kobayashi, Y., Konishi, M., Yokoi, M., Ishida, S., Suzuki, S., and Kohara, M. (1994). Hepatitis C virus particle detected by immunoelectron microscopic study. *J Gen Virol* 75 ( Pt 7), 1755-1760.
- Karlas, A., Machuy, N., Shin, Y., Pleissner, K.P., Artarini, A., Heuer, D., Becker, D., Khalil, H., Ogilvie, L.A., Hess, S., *et al.* (2010). Genome-wide RNAi screen identifies human host factors crucial for influenza virus replication. *Nature* 463, 818-822.
- Kato, N. (2001). Molecular virology of hepatitis C virus. *Acta Med Okayama* 55, 133-159.
- Kato, N., Sekiya, H., Ootsuyama, Y., Nakazawa, T., Hijikata, M., Ohkoshi, S., and Shimotohno, K. (1993). Humoral immune response to hypervariable region 1 of the putative envelope glycoprotein (gp70) of hepatitis C virus. *J Virol* 67, 3923-3930.
- Kaul, A., Stauffer, S., Berger, C., Pertel, T., Schmitt, J., Kallis, S., Zayas, M., Lohmann, V., Luban, J., and Bartenschlager, R. (2009). Essential role of cyclophilin A for hepatitis C virus replication and virus production and possible link to polyprotein cleavage kinetics. *PLoS Pathog* 5, e1000546.
- Kazazic, M., Roepstorff, K., Johannessen, L.E., Pedersen, N.M., van Deurs, B., Stang, E., and Madhus, I.H. (2006). EGF-induced activation of the EGF receptor does not trigger mobilization of caveolae. *Traffic* 7, 1518-1527.

- Kim, E.S., Khuri, F.R., and Herbst, R.S. (2001). Epidermal growth factor receptor biology (IMC-C225). *Curr Opin Oncol* 13, 506-513.
- Kim, J.L., Morgenstern, K.A., Lin, C., Fox, T., Dwyer, M.D., Landro, J.A., Chambers, S.P., Markland, W., Lepre, C.A., O'Malley, E.T., *et al.* (1996). Crystal structure of the hepatitis C virus NS3 protease domain complexed with a synthetic NS4A cofactor peptide. *Cell* 87, 343-355.
- Kinbara, K., Goldfinger, L.E., Hansen, M., Chou, F.L., and Ginsberg, M.H. (2003). Ras GTPases: integrins' friends or foes? *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 767-776.
- Koike, K., Moriya, K., and Matsuura, Y. (2010). Animal models for hepatitis C and related liver disease. *Hepato Res* 40, 69-82.
- Kolch, W. (2000). Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J* 351 Pt 2, 289-305.
- Kolch, W. (2005). Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 827-837.
- Kolykhalov, A.A., Feinstone, S.M., and Rice, C.M. (1996). Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *J Virol* 70, 3363-3371.
- Kolykhalov, A.A., Mihalik, K., Feinstone, S.M., and Rice, C.M. (2000). Hepatitis C virus-encoded enzymatic activities and conserved RNA elements in the 3' nontranslated region are essential for virus replication in vivo. *J Virol* 74, 2046-2051.
- Koutsoudakis, G., Herrmann, E., Kallis, S., Bartenschlager, R., and Pietschmann, T. (2007). The level of CD81 cell surface expression is a key determinant for productive entry of hepatitis C virus into host cells. *J Virol* 81, 588-598.
- 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.
- Kraus, M.H., Yuasa, Y., and Aaronson, S.A. (1984). A position 12-activated H-ras oncogene in all HS578T mammary carcinosarcoma cells but not normal mammary cells of the same patient. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 5384-5388.
- Krieger, M. (2001). Scavenger receptor class B type I is a multiligand HDL receptor that influences diverse physiologic systems. *J Clin Invest* 108, 793-797.
- Krieger, S.E., Zeisel, M.B., Davis, C., Thumann, C., Harris, H.J., Schnober, E.K., Mee, C., Soulier, E., Royer, C., Lambotin, M., *et al.* (2010). Inhibition of hepatitis C virus infection by anti-claudin-1 antibodies is mediated by neutralization of E2-CD81-claudin-1 associations. *Hepatology* 51, 1144-1157.

- Kuiken, C., and Simmonds, P. (2009). Nomenclature and numbering of the hepatitis C virus. *Methods Mol Biol* 510, 33-53.
- Kullander, K., and Klein, R. (2002). Mechanisms and functions of Eph and ephrin signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 475-486.
- Kyriakis, J.M., and Avruch, J. (2001). Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 81, 807-869.
- Lacek, K., Vercauteren, K., Grzyb, K., Naddeo, M., Verhoye, L., Slowikowski, M.P., Fafi-Kremer, S., Patel, A.H., Baumert, T.F., Folgori, A., *et al.* (2012). Novel human SR-BI antibodies prevent infection and dissemination of HCV in vitro and in humanized mice. *J Hepatol* 57, 17-23.
- Lackmann, M., and Boyd, A.W. (2008). Eph, a protein family coming of age: more confusion, insight, or complexity? *Sci Signal* 1, re2.
- Lai, M.M., and Ware, C.F. (2000). Hepatitis C virus core protein: possible roles in viral pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 242, 117-134.
- Lai, W.K., Sun, P.J., Zhang, J., Jennings, A., Lalor, P.F., Hubscher, S., McKeating, J.A., and Adams, D.H. (2006). Expression of DC-SIGN and DC-SIGNR on human sinusoidal endothelium: a role for capturing hepatitis C virus particles. *Am J Pathol* 169, 200-208.
- Lanford, R.E., Hildebrandt-Eriksen, E.S., Petri, A., Persson, R., Lindow, M., Munk, M.E., Kauppinen, S., and Orum, H. (2010). Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science* 327, 198-201.
- Lauer, G.M., and Walker, B.D. (2001). Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 345, 41-52.
- Lavanchy, D. (2009). The global burden of hepatitis C. *Liver Int* 29 *Suppl* 1, 74-81.
- Lavanchy, D. (2011). Evolving epidemiology of hepatitis C virus. *Clin Microbiol Infect* 17, 107-115.
- Lavillette, D., Bartosch, B., Nourrisson, D., Verney, G., Cosset, F.L., Penin, F., and Pecheur, E.I. (2006). Hepatitis C virus glycoproteins mediate low pH-dependent membrane fusion with liposomes. *J Biol Chem* 281, 3909-3917.
- Lavillette, D., Morice, Y., Germanidis, G., Donot, P., Soulier, A., Pagkalos, E., Sakellariou, G., Intrator, L., Bartosch, B., Pawlotsky, J.M., *et al.* (2005). Human serum facilitates hepatitis C virus infection, and neutralizing responses inversely correlate with viral replication kinetics at the acute phase of hepatitis C virus infection. *J Virol* 79, 6023-6034.
- Lavillette, D., Pecheur, E.I., Donot, P., Fresquet, J., Molle, J., Corbau, R., Dreux, M., Penin, F., and Cosset, F.L. (2007). Characterization of fusion determinants points to the involvement of

- three discrete regions of both E1 and E2 glycoproteins in the membrane fusion process of hepatitis C virus. *J Virol* 81, 8752-8765.
- Law, M., Maruyama, T., Lewis, J., Giang, E., Tarr, A.W., Stamatakis, Z., Gastaminza, P., Chisari, F.V., Jones, I.M., Fox, R.I., *et al.* (2008). Broadly neutralizing antibodies protect against hepatitis C virus quasispecies challenge. *Nat Med* 14, 25-27.
- Le Naour, F., Andre, M., Boucheix, C., and Rubinstein, E. (2006). Membrane microdomains and proteomics: lessons from tetraspanin microdomains and comparison with lipid rafts. *Proteomics* 6, 6447-6454.
- Levkowitz, G., Waterman, H., Zamir, E., Kam, Z., Oved, S., Langdon, W.Y., Beguinot, L., Geiger, B., and Yarden, Y. (1998). c-Cbl/Sli-1 regulates endocytic sorting and ubiquitination of the epidermal growth factor receptor. *Genes Dev* 12, 3663-3674.
- Li, J., Rix, U., Fang, B., Bai, Y., Edwards, A., Colinge, J., Bennett, K.L., Gao, J., Song, L., Eschrich, S., *et al.* (2010). A chemical and phosphoproteomic characterization of dasatinib action in lung cancer. *Nat Chem Biol* 6, 291-299.
- Li, S., Schmitz, K.R., Jeffrey, P.D., Wiltzius, J.J., Kussie, P., and Ferguson, K.M. (2005). Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab. *Cancer Cell* 7, 301-311.
- Li, Y.P., Gottwein, J.M., Scheel, T.K., Jensen, T.B., and Bukh, J. (2011). MicroRNA-122 antagonism against hepatitis C virus genotypes 1-6 and reduced efficacy by host RNA insertion or mutations in the HCV 5' UTR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 4991-4996.
- Liebmann, C. (2001). Regulation of MAP kinase activity by peptide receptor signalling pathway: paradigms of multiplicity. *Cell Signal* 13, 777-785.
- Lima, J.P. (1980). [Anatomy and physiology of the liver secretory apparatus]. *Arq Gastroenterol* 17, 149-160.
- Lin, S.Y., Makino, K., Xia, W., Matin, A., Wen, Y., Kwong, K.Y., Bourguignon, L., and Hung, M.C. (2001). Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nat Cell Biol* 3, 802-808.
- Lindberg, R.A., and Hunter, T. (1990). cDNA cloning and characterization of eck, an epithelial cell receptor protein-tyrosine kinase in the eph/elk family of protein kinases. *Mol Cell Biol* 10, 6316-6324.
- Lindenbach, B.D., Evans, M.J., Syder, A.J., Wolk, B., Tellinghuisen, T.L., Liu, C.C., Maruyama, T., Hynes, R.O., Burton, D.R., McKeating, J.A., *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., Lanford, R.E., Feinstone, S.M., Major, M.E., Leroux-Roels, G., *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, 3805-3809.
- Liu, S., Yang, W., Shen, L., Turner, J.R., Coyne, C.B., and Wang, T. (2009). Tight junction proteins claudin-1 and occludin control hepatitis C virus entry and are downregulated during infection to prevent superinfection. *J Virol* 83, 2011-2014.
- Liu, Z., Tian, Y., Machida, K., Lai, M.M., Luo, G., Fong, S.K., and Ou, J.H. (2012). Transient Activation of the PI3K-AKT Pathway by Hepatitis C Virus to Enhance Viral Entry. *J Biol Chem* 287, 41922-41930.
- Lohmann, V., Korner, F., Dobierzewska, A., and Bartenschlager, R. (2001). Mutations in hepatitis C virus RNAs conferring cell culture adaptation. *J Virol* 75, 1437-1449.
- Lohmann, V., Korner, F., Koch, J., Herian, U., Theilmann, L., and Bartenschlager, R. (1999). Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 285, 110-113.
- Lok, A.S., Gardiner, D.F., Lawitz, E., Martorell, C., Everson, G.T., Ghalib, R., Reindollar, R., Rustgi, V., McPhee, F., Wind-Rotolo, M., *et al.* (2012). Preliminary study of two antiviral agents for hepatitis C genotype 1. *N Engl J Med* 366, 216-224.
- Longva, K.E., Blystad, F.D., Stang, E., Larsen, A.M., Johannessen, L.E., and Madshus, I.H. (2002). Ubiquitination and proteasomal activity is required for transport of the EGF receptor to inner membranes of multivesicular bodies. *J Cell Biol* 156, 843-854.
- Lorenz, I.C., Marcotrigiano, J., Dentzer, T.G., and Rice, C.M. (2006). Structure of the catalytic domain of the hepatitis C virus NS2-3 protease. *Nature* 442, 831-835.
- Lozach, P.Y., Amara, A., Bartosch, B., Virelizier, J.L., Arenzana-Seisdedos, F., Cosset, F.L., and Altmeyer, R. (2004). C-type lectins L-SIGN and DC-SIGN capture and transmit infectious hepatitis C virus pseudotype particles. *J Biol Chem* 279, 32035-32045.
- Lupberger, J., Zeisel, M.B., Xiao, F., Thumann, C., Fofana, I., Zona, L., Davis, C., Mee, C.J., Turek, M., Gorke, S., *et al.* (2011). EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy. *Nat Med* 17, 589-595.
- Macdonald, A., Crowder, K., Street, A., McCormick, C., Saksela, K., and Harris, M. (2003). The hepatitis C virus non-structural NS5A protein inhibits activating protein-1 function by perturbing ras-ERK pathway signaling. *J Biol Chem* 278, 17775-17784.

- 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.
- Majumder, M., Ghosh, A.K., Steele, R., Ray, R., and Ray, R.B. (2001). Hepatitis C virus NS5A physically associates with p53 and regulates p21/waf1 gene expression in a p53-dependent manner. *J Virol* 75, 1401-1407.
- Mankouri, J., Griffin, S., and Harris, M. (2008). The hepatitis C virus non-structural protein NS5A alters the trafficking profile of the epidermal growth factor receptor. *Traffic* 9, 1497-1509.
- Marsh, M., and Helenius, A. (2006). Virus entry: open sesame. *Cell* 124, 729-740.
- Martell, M., Esteban, J.I., Quer, J., Genesca, J., Weiner, A., Esteban, R., Guardia, J., and Gomez, J. (1992). Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *J Virol* 66, 3225-3229.
- Martin, F., Roth, D.M., Jans, D.A., Pouton, C.W., Partridge, L.J., Monk, P.N., and Moseley, G.W. (2005). Tetraspanins in viral infections: a fundamental role in viral biology? *J Virol* 79, 10839-10851.
- McCole, D.F., Keely, S.J., Coffey, R.J., and Barrett, K.E. (2002). Transactivation of the epidermal growth factor receptor in colonic epithelial cells by carbachol requires extracellular release of transforming growth factor-alpha. *J Biol Chem* 277, 42603-42612.
- McKeating, J.A., Zhang, L.Q., Logvinoff, C., Flint, M., Zhang, J., Yu, J., Butera, D., Ho, D.D., Dustin, L.B., Rice, C.M., *et al.* (2004). Diverse hepatitis C virus glycoproteins mediate viral infection in a CD81-dependent manner. *J Virol* 78, 8496-8505.
- McLauchlan, J., Lemberg, M.K., Hope, G., and Martoglio, B. (2002). Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *EMBO J* 21, 3980-3988.
- McMullan, L.K., Grakoui, A., Evans, M.J., Mihalik, K., Puig, M., Branch, A.D., Feinstone, S.M., and Rice, C.M. (2007). Evidence for a functional RNA element in the hepatitis C virus core gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 2879-2884.
- Mee, C.J., Grove, J., Harris, H.J., Hu, K., Balfe, P., and McKeating, J.A. (2008). Effect of cell polarization on hepatitis C virus entry. *J Virol* 82, 461-470.
- Mee, C.J., Harris, H.J., Farquhar, M.J., Wilson, G., Reynolds, G., Davis, C., van Ijzendoorn, S.C., Balfe, P., and McKeating, J.A. (2009a). Polarization restricts hepatitis C virus entry into HepG2 hepatoma cells. *J Virol* 83, 6211-6221.
- Mee, C.J., Harris, H.J., Farquhar, M.J., Wilson, G., Reynolds, G., Davis, C., van, I.S.C., Balfe, P., and McKeating, J.A. (2009b). Polarization restricts hepatitis C virus entry into HepG2 hepatoma cells. *J Virol* 83, 6211-6221.



- Meertens, L., Bertaux, C., Cukierman, L., Cormier, E., Lavillette, D., Cosset, F.L., and Dragic, T. (2008). The tight junction proteins claudin-1, -6, and -9 are entry cofactors for hepatitis C virus. *J Virol* 82, 3555-3560.
- Meertens, L., Bertaux, C., and Dragic, T. (2006). Hepatitis C virus entry requires a critical postinternalization step and delivery to early endosomes via clathrin-coated vesicles. *J Virol* 80, 11571-11578.
- Mendelsohn, J., and Baselga, J. (2006). Epidermal growth factor receptor targeting in cancer. *Semin Oncol* 33, 369-385.
- Mercer, D.F., Schiller, D.E., Elliott, J.F., Douglas, D.N., Hao, C., Rinfret, A., Addison, W.R., Fischer, K.P., Churchill, T.A., Lakey, J.R., *et al.* (2001). Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat Med* 7, 927-933.
- Meuleman, P., Catanese, M.T., Verhoye, L., Desombere, I., Farhoudi, A., Jones, C.T., Sheahan, T., Grzyb, K., Cortese, R., Rice, C.M., *et al.* (2012). A human monoclonal antibody targeting scavenger receptor class B type I precludes hepatitis C virus infection and viral spread in vitro and in vivo. *Hepatology* 55, 364-372.
- Meuleman, P., Hesselgesser, J., Paulson, M., Vanwollegem, T., Desombere, I., Reiser, H., and Leroux-Roels, G. (2008). Anti-CD81 antibodies can prevent a hepatitis C virus infection in vivo. *Hepatology* 48, 1761-1768.
- Meuleman, P., and Leroux-Roels, G. (2008). The human liver-uPA-SCID mouse: a model for the evaluation of antiviral compounds against HBV and HCV. *Antiviral Res* 80, 231-238.
- Meuleman, P., Libbrecht, L., De Vos, R., de Hemptinne, B., Gevaert, K., Vandekerckhove, J., Roskams, T., and Leroux-Roels, G. (2005). Morphological and biochemical characterization of a human liver in a uPA-SCID mouse chimera. *Hepatology* 41, 847-856.
- Meunier, J.C., Engle, R.E., Faulk, K., Zhao, M., Bartosch, B., Alter, H., Emerson, S.U., Cosset, F.L., Purcell, R.H., and Bukh, J. (2005). Evidence for cross-genotype neutralization of hepatitis C virus pseudo-particles and enhancement of infectivity by apolipoprotein C1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 4560-4565.
- Meylan, E., Curran, J., Hofmann, K., Moradpour, D., Binder, M., Bartenschlager, R., and Tschoopp, J. (2005). Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* 437, 1167-1172.
- Miaczynska, M., Pelkmans, L., and Zerial, M. (2004). Not just a sink: endosomes in control of signal transduction. *Curr Opin Cell Biol* 16, 400-406.
- Miao, H., Li, D.Q., Mukherjee, A., Guo, H., Petty, A., Cutter, J., Basilion, J.P., Sedor, J., Wu, J., Danielpour, D., *et al.* (2009). EphA2 mediates ligand-dependent inhibition and ligand-

- independent promotion of cell migration and invasion via a reciprocal regulatory loop with Akt. *Cancer Cell* 16, 9-20.
- Miao, H., and Wang, B. (2009). Eph/ephrin signaling in epithelial development and homeostasis. *Int J Biochem Cell Biol* 41, 762-770.
- Miura, K., Nam, J.M., Kojima, C., Mochizuki, N., and Sabe, H. (2009). EphA2 engages Git1 to suppress Arf6 activity modulating epithelial cell-cell contacts. *Mol Biol Cell* 20, 1949-1959.
- Miyanari, Y., Atsuzawa, K., Usuda, N., Watashi, K., Hishiki, T., Zayas, M., Bartenschlager, R., Wakita, T., Hijikata, M., and Shimotohno, K. (2007). The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol* 9, 1089-1097.
- Molina, S., Castet, V., Fournier-Wirth, C., Pichard-Garcia, L., Avner, R., Harats, D., Roitelman, J., Barbaras, R., Graber, P., Ghersa, P., *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, 411-419.
- Moradpour, D., Penin, F., and Rice, C.M. (2007). Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Microbiol* 5, 453-463.
- Morandell, S., Stasyk, T., Skvortsov, S., Ascher, S., and Huber, L.A. (2008). Quantitative proteomics and phosphoproteomics reveal novel insights into complexity and dynamics of the EGFR signaling network. *Proteomics* 8, 4383-4401.
- Morello, V., Cabodi, S., Sigismund, S., Camacho-Leal, M.P., Repetto, D., Volante, M., Papotti, M., Turco, E., and Defilippi, P. (2011). beta1 integrin controls EGFR signaling and tumorigenic properties of lung cancer cells. *Oncogene* 30, 4087-4096.
- Morikawa, K., Zhao, Z., Date, T., Miyamoto, M., Murayama, A., Akazawa, D., Tanabe, J., Sone, S., and Wakita, T. (2007). The roles of CD81 and glycosaminoglycans in the adsorption and uptake of infectious HCV particles. *J Med Virol* 79, 714-723.
- Moro, L., Venturino, M., Bozzo, C., Silengo, L., Altruda, F., Beguinot, L., Tarone, G., and Defilippi, P. (1998). Integrins induce activation of EGF receptor: role in MAP kinase induction and adhesion-dependent cell survival. *EMBO J* 17, 6622-6632.
- Moscatello, D.K., Montgomery, R.B., Sundareshan, P., McDanel, H., Wong, M.Y., and Wong, A.J. (1996). Transformational and altered signal transduction by a naturally occurring mutant EGF receptor. *Oncogene* 13, 85-96.
- Moulder, S.L., Yakes, F.M., Muthuswamy, S.K., Bianco, R., Simpson, J.F., and Arteaga, C.L. (2001). Epidermal growth factor receptor (HER1) tyrosine kinase inhibitor ZD1839 (Iressa) inhibits HER2/neu (erbB2)-overexpressing breast cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Res* 61, 8887-8895.

Munir, S., Saleem, S., Idrees, M., Tariq, A., Butt, S., Rauff, B., Hussain, A., Badar, S., Naudhani, M., Fatima, Z., *et al.* (2010). Hepatitis C treatment: current and future perspectives. *Virology* 7, 296.

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

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

Neveu, G., Barouch-Bentov, R., Ziv-Av, A., Gerber, D., Jacob, Y., and Einav, S. (2012). Identification and Targeting of an Interaction between a Tyrosine Motif within Hepatitis C Virus Core Protein and AP2M1 Essential for Viral Assembly. *PLoS Pathog* 8, e1002845.

Newell, P., Toffanin, S., Villanueva, A., Chiang, D.Y., Minguéz, B., Cabellos, L., Savic, R., Hoshida, Y., Lim, K.H., Melgar-Lesmes, P., *et al.* (2009). Ras pathway activation in hepatocellular carcinoma and anti-tumoral effect of combined sorafenib and rapamycin in vivo. *J Hepatol* 51, 725-733.

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

Nitta, S., Sakamoto, N., Nakagawa, M., Kakinuma, S., Mishima, K., Kusano-Kitazume, A., Kiyohashi, K., Murakawa, M., Nishimura-Sakurai, Y., Azuma, S., *et al.* (2012). Hepatitis C virus NS4B protein targets STING and abrogates RIG-I-mediated type-I interferon-dependent innate immunity. *Hepatology*.

Okutani, T., Okabayashi, Y., Kido, Y., Sugimoto, Y., Sakaguchi, K., Matuoka, K., Takenawa, T., and Kasuga, M. (1994). Grb2/Ash binds directly to tyrosines 1068 and 1086 and indirectly to tyrosine 1148 of activated human epidermal growth factor receptors in intact cells. *J Biol Chem* 269, 31310-31314.

Op De Beeck, A., Cocquerel, L., and Dubuisson, J. (2001). Biogenesis of hepatitis C virus envelope glycoproteins. *J Gen Virol* 82, 2589-2595.

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

- Owsianka, A., Tarr, A.W., Juttla, V.S., Lavillette, D., Bartosch, B., Cosset, F.L., Ball, J.K., and Patel, A.H. (2005). Monoclonal antibody AP33 defines a broadly neutralizing epitope on the hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein. *J Virol* 79, 11095-11104.
- Paris, L., Tonutti, L., Vannini, C., and Bazzoni, G. (2008). Structural organization of the tight junctions. *Biochim Biophys Acta* 1778, 646-659.
- Pasquale, E.B. (2005). Eph receptor signalling casts a wide net on cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 462-475.
- Pasquale, E.B. (2008). Eph-ephrin bidirectional signaling in physiology and disease. *Cell* 133, 38-52.
- Patil, V.M., Gupta, S.P., Samanta, S., and Masand, N. (2011). Current perspective of HCV NS5B inhibitors: a review. *Curr Med Chem* 18, 5564-5597.
- Patterson, R.L., van Rossum, D.B., Nikolaidis, N., Gill, D.L., and Snyder, S.H. (2005). Phospholipase C-gamma: diverse roles in receptor-mediated calcium signaling. *Trends Biochem Sci* 30, 688-697.
- Pawlotsky, J.M. (2011). Treatment failure and resistance with direct-acting antiviral drugs against hepatitis C virus. *Hepatology* 53, 1742-1751.
- Pawson, T. (2004). Specificity in signal transduction: from phosphotyrosine-SH2 domain interactions to complex cellular systems. *Cell* 116, 191-203.
- Pawson, T., and Nash, P. (2003). Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains. *Science* 300, 445-452.
- Pelkmans, L., Fava, E., Grabner, H., Hannus, M., Habermann, B., Krausz, E., and Zerial, M. (2005). Genome-wide analysis of human kinases in clathrin- and caveolae/raft-mediated endocytosis. *Nature* 436, 78-86.
- Penin, F., Brass, V., Appel, N., Ramboarina, S., Montserret, R., Ficheux, D., Blum, H.E., Bartenschlager, R., and Moradpour, D. (2004a). Structure and function of the membrane anchor domain of hepatitis C virus nonstructural protein 5A. *J Biol Chem* 279, 40835-40843.
- Penin, F., Dubuisson, J., Rey, F.A., Moradpour, D., and Pawlotsky, J.M. (2004b). Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology* 39, 5-19.
- Perrault, M., and Pecheur, E.I. (2009). The hepatitis C virus and its hepatic environment: a toxic but finely tuned partnership. *Biochem J* 423, 303-314.
- Pestka, J.M., Zeisel, M.B., Blaser, E., Schurmann, P., Bartosch, B., Cosset, F.L., Patel, A.H., Meisel, H., Baumert, J., Viazov, S., *et al.* (2007). Rapid induction of virus-neutralizing antibodies

- and viral clearance in a single-source outbreak of hepatitis C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 6025-6030.
- Petracca, R., Falugi, F., Galli, G., Norais, N., Rosa, D., Campagnoli, S., Burgio, V., Di Stasio, E., Giardina, B., Houghton, M., *et al.* (2000). Structure-function analysis of hepatitis C virus envelope-CD81 binding. *J Virol* 74, 4824-4830.
- Pfannkuche, A., Buther, K., Karthe, J., Poenisch, M., Bartenschlager, R., Trilling, M., Hengel, H., Willbold, D., Haussinger, D., and Bode, J.G. (2011). c-Src is required for complex formation between the hepatitis C virus-encoded proteins NS5A and NS5B: a prerequisite for replication. *Hepatology* 53, 1127-1136.
- Pietschmann, T., Kaul, A., Koutsoudakis, G., Shavinskaya, A., Kallis, S., Steinmann, E., Abid, K., Negro, F., Dreux, M., Cosset, F.L., *et al.* (2006). Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 7408-7413.
- Pietschmann, T., Lohmann, V., Kaul, A., Krieger, N., Rinck, G., Rutter, G., Strand, D., and Bartenschlager, R. (2002). Persistent and transient replication of full-length hepatitis C virus genomes in cell culture. *J Virol* 76, 4008-4021.
- Pileri, P., Uematsu, Y., Campagnoli, S., Galli, G., Falugi, F., Petracca, R., Weiner, A.J., Houghton, M., Rosa, D., Grandi, G., *et al.* (1998). Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 282, 938-941.
- Ploss, A., and Dubuisson, J. (2012). New advances in the molecular biology of hepatitis C virus infection: towards the identification of new treatment targets. *Gut* 61 *Suppl* 1, i25-35.
- Ploss, A., Evans, M.J., Gaysinskaya, V.A., Panis, M., You, H., de Jong, Y.P., and Rice, C.M. (2009). Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature* 457, 882-886.
- Ploss, A., and Rice, C.M. (2009). Towards a small animal model for hepatitis C. *EMBO Rep* 10, 1220-1227.
- Pohlmann, S., Zhang, J., Baribaud, F., Chen, Z., Leslie, G.J., Lin, G., Granelli-Piperno, A., Doms, R.W., Rice, C.M., and McKeating, J.A. (2003). Hepatitis C virus glycoproteins interact with DC-SIGN and DC-SIGNR. *J Virol* 77, 4070-4080.
- Popescu, C.I., Callens, N., Trinel, D., Roingard, P., Moradpour, D., Descamps, V., Duverlie, G., Penin, F., Heliot, L., Rouille, Y., *et al.* (2011). NS2 protein of hepatitis C virus interacts with structural and non-structural proteins towards virus assembly. *PLoS Pathog* 7, e1001278.
- Press, M.F., and Lenz, H.J. (2007). EGFR, HER2 and VEGF pathways: validated targets for cancer treatment. *Drugs* 67, 2045-2075.

- Prior, I.A., Harding, A., Yan, J., Sluimer, J., Parton, R.G., and Hancock, J.F. (2001). GTP-dependent segregation of H-ras from lipid rafts is required for biological activity. *Nat Cell Biol* 3, 368-375.
- Puig, M., Major, M.E., Mihalik, K., and Feinstone, S.M. (2004). Immunization of chimpanzees with an envelope protein-based vaccine enhances specific humoral and cellular immune responses that delay hepatitis C virus infection. *Vaccine* 22, 991-1000.
- Rao, R. (2009). Occludin phosphorylation in regulation of epithelial tight junctions. *Ann N Y Acad Sci* 1165, 62-68.
- Rasheed, B.K., Wiltshire, R.N., Bigner, S.H., and Bigner, D.D. (1999). Molecular pathogenesis of malignant gliomas. *Curr Opin Oncol* 11, 162-167.
- Reiter, J.L., and Maihle, N.J. (1996). A 1.8 kb alternative transcript from the human epidermal growth factor receptor gene encodes a truncated form of the receptor. *Nucleic Acids Res* 24, 4050-4056.
- Reynolds, G.M., Harris, H.J., Jennings, A., Hu, K., Grove, J., Lalor, P.F., Adams, D.H., Balfe, P., Hubscher, S.G., and McKeating, J.A. (2008). Hepatitis C virus receptor expression in normal and diseased liver tissue. *Hepatology* 47, 418-427.
- Rhinds, D., Bourgeois, P., Bourret, G., Huard, K., Falstraalt, L., and Brissette, L. (2004). Localization and regulation of SR-BI in membrane rafts of HepG2 cells. *J Cell Sci* 117, 3095-3105.
- Robinet, E., and Baumert, T.F. (2011). A first step towards a mouse model for hepatitis C virus infection containing a human immune system. *J Hepatol* 55, 718-720.
- Robinson, M., Tian, Y., Delaney, W.E.t., and Greenstein, A.E. (2011a). Preexisting drug-resistance mutations reveal unique barriers to resistance for distinct antivirals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 10290-10295.
- Robinson, M., Tian, Y., Pagnatis, N., and Delaney, W.E.t. (2011b). Screening of hepatitis C virus inhibitors using genotype 1a HCV replicon cell lines. *Curr Protoc Microbiol Chapter 17*, Unit17 17.
- Rocha-Perugini, V., Montpellier, C., Delgrange, D., Wychowski, C., Helle, F., Pillez, A., Drobecq, H., Le Naour, F., Charrin, S., Levy, S., *et al.* (2008). The CD81 partner EWI-2wint inhibits hepatitis C virus entry. *PLoS One* 3, e1866.
- Rosa, D., Campagnoli, S., Moretto, C., Guenzi, E., Cousens, L., Chin, M., Dong, C., Weiner, A.J., Lau, J.Y., Choo, Q.L., *et al.* (1996). A quantitative test to estimate neutralizing antibodies to the hepatitis C virus: cytofluorimetric assessment of envelope glycoprotein 2 binding to target cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 1759-1763.

- Rumin, S., Berthillon, P., Tanaka, E., Kiyosawa, K., Trabaud, M.A., Bizollon, T., Gouillat, C., Gripon, P., Guguen-Guillouzo, C., Inchauspe, G., *et al.* (1999). Dynamic analysis of hepatitis C virus replication and quasispecies selection in long-term cultures of adult human hepatocytes infected in vitro. *J Gen Virol* 80 ( Pt 11), 3007-3018.
- Sainz, B., Jr., Barretto, N., Martin, D.N., Hiraga, N., Imamura, M., Hussain, S., Marsh, K.A., Yu, X., Chayama, K., Alrefai, W.A., *et al.* (2012a). Identification of the Niemann-Pick C1-like 1 cholesterol absorption receptor as a new hepatitis C virus entry factor. *Nat Med* 18, 281-285.
- Sainz, B., Jr., Barretto, N., Yu, X., Corcoran, P., and Uprichard, S.L. (2012b). Permissiveness of human hepatoma cell lines for HCV infection. *Virology* 443, 29-30.
- Sakai, A., Claire, M.S., Faulk, K., Govindarajan, S., Emerson, S.U., Purcell, R.H., and Bukh, J. (2003). The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 11646-11651.
- Sala-Valdes, M., Ursa, A., Charrin, S., Rubinstein, E., Hemler, M.E., Sanchez-Madrid, F., and Yanez-Mo, M. (2006). EWI-2 and EWI-F link the tetraspanin web to the actin cytoskeleton through their direct association with ezrin-radixin-moesin proteins. *J Biol Chem* 281, 19665-19675.
- Salcini, A.E., Chen, H., Iannolo, G., De Camilli, P., and Di Fiore, P.P. (1999). Epidermal growth factor pathway substrate 15, Eps15. *Int J Biochem Cell Biol* 31, 805-809.
- Sarrazin, C., Hezode, C., Zeuzem, S., and Pawlotsky, J.M. (2012). Antiviral strategies in hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 56 Suppl 1, S88-100.
- Scarselli, E., Ansuini, H., Cerino, R., Roccasecca, R.M., Acali, S., Filocamo, G., Traboni, C., Nicosia, A., Cortese, R., and Vitelli, A. (2002). The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J* 21, 5017-5025.
- Scheel, T.K., Gottwein, J.M., Carlsen, T.H., Li, Y.P., Jensen, T.B., Spengler, U., Weis, N., and Bukh, J. (2011a). Efficient culture adaptation of hepatitis C virus recombinants with genotype-specific core-NS2 by using previously identified mutations. *J Virol* 85, 2891-2906.
- Scheel, T.K., Gottwein, J.M., Mikkelsen, L.S., Jensen, T.B., and Bukh, J. (2011b). Recombinant HCV variants with NS5A from genotypes 1-7 have different sensitivities to an NS5A inhibitor but not interferon-alpha. *Gastroenterology* 140, 1032-1042.
- Schelhaas, M. (2010). Come in and take your coat off - how host cells provide endocytosis for virus entry. *Cell Microbiol* 12, 1378-1388.
- Schlessinger, J. (2000). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103, 211-225.
- Schlessinger, J. (2002). Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. *Cell* 110, 669-672.



- Schlessinger, J., and Lemmon, M.A. (2003). SH2 and PTB domains in tyrosine kinase signaling. *Sci STKE* 2003, RE12.
- Schneider, M.R., and Wolf, E. (2009). The epidermal growth factor receptor ligands at a glance. *J Cell Physiol* 218, 460-466.
- Schuster, C., and Baumert, T.F. (2009). EWI-2wint--a host cell factor inhibiting hepatitis C virus entry. *J Hepatol* 50, 222-224.
- Schwarz, A.K., Grove, J., Hu, K., Mee, C.J., Balfe, P., and McKeating, J.A. (2009). Hepatoma cell density promotes claudin-1 and scavenger receptor BI expression and hepatitis C virus internalization. *J Virol* 83, 12407-12414.
- Schwer, B., Ren, S., Pietschmann, T., Kartenbeck, J., Kaehlcke, K., Bartenschlager, R., Yen, T.S., and Ott, M. (2004). Targeting of hepatitis C virus core protein to mitochondria through a novel C-terminal localization motif. *J Virol* 78, 7958-7968.
- Sebolt-Leopold, J.S., and Herrera, R. (2004). Targeting the mitogen-activated protein kinase cascade to treat cancer. *Nat Rev Cancer* 4, 937-947.
- Shepard, C.W., Finelli, L., and Alter, M.J. (2005). Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis* 5, 558-567.
- Shepherd, F.A., Rodrigues Pereira, J., Ciuleanu, T., Tan, E.H., Hirsh, V., Thongprasert, S., Campos, D., Maoleekoonpiroj, S., Smylie, M., Martins, R., *et al.* (2005). Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 353, 123-132.
- Sieg, D.J., Hauck, C.R., Ilic, D., Klingbeil, C.K., Schaefer, E., Damsky, C.H., and Schlaepfer, D.D. (2000). FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. *Nat Cell Biol* 2, 249-256.
- Simmonds, P., Bukh, J., Combet, C., Deleage, G., Enomoto, N., Feinstone, S., Halfon, P., Inchauspe, G., Kuiken, C., Maertens, G., *et al.* (2005). Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 42, 962-973.
- Song, Y., Friebe, P., Tzima, E., Junemann, C., Bartenschlager, R., and Niepmann, M. (2006). The hepatitis C virus RNA 3'-untranslated region strongly enhances translation directed by the internal ribosome entry site. *J Virol* 80, 11579-11588.
- Soroceanu, L., Akhavan, A., and Cobbs, C.S. (2008). Platelet-derived growth factor-alpha receptor activation is required for human cytomegalovirus infection. *Nature* 455, 391-395.
- Spahn, C.M., Kieft, J.S., Grassucci, R.A., Penczek, P.A., Zhou, K., Doudna, J.A., and Frank, J. (2001). Hepatitis C virus IRES RNA-induced changes in the conformation of the 40s ribosomal subunit. *Science* 291, 1959-1962.

- Stamos, J., Sliwkowski, M.X., and Eigenbrot, C. (2002). Structure of the epidermal growth factor receptor kinase domain alone and in complex with a 4-anilinoquinazoline inhibitor. *J Biol Chem* 277, 46265-46272.
- Stang, E., Blystad, F.D., Kazazic, M., Bertelsen, V., Brodahl, T., Raiborg, C., Stenmark, H., and Madshus, I.H. (2004). Cbl-dependent ubiquitination is required for progression of EGF receptors into clathrin-coated pits. *Mol Biol Cell* 15, 3591-3604.
- Steinmann, D., Barth, H., Gissler, B., Schurmann, P., Adah, M.I., Gerlach, J.T., Pape, G.R., Depla, E., Jacobs, D., Maertens, G., *et al.* (2004). Inhibition of hepatitis C virus-like particle binding to target cells by antiviral antibodies in acute and chronic hepatitis C. *J Virol* 78, 9030-9040.
- Steinmann, E., Penin, F., Kallis, S., Patel, A.H., Bartenschlager, R., and Pietschmann, T. (2007). Hepatitis C virus p7 protein is crucial for assembly and release of infectious virions. *PLoS Pathog* 3, e103.
- Stewart, P.L., and Nemerow, G.R. (2007). Cell integrins: commonly used receptors for diverse viral pathogens. *Trends Microbiol* 15, 500-507.
- Stokoe, D., Stephens, L.R., Copeland, T., Gaffney, P.R., Reese, C.B., Painter, G.F., Holmes, A.B., McCormick, F., and Hawkins, P.T. (1997). Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase B. *Science* 277, 567-570.
- Suratane, A., Rebhan, I., Matula, P., Kumar, A., Kaderali, L., Rohr, K., Bartenschlager, R., Eils, R., and König, R. (2010). Detecting host factors involved in virus infection by observing the clustering of infected cells in siRNA screening images. *Bioinformatics* 26, i653-658.
- Suzuki, R., Sakamoto, S., Tsutsumi, T., Rikimaru, A., Tanaka, K., Shimoike, T., Moriishi, K., Iwasaki, T., Mizumoto, K., Matsuura, Y., *et al.* (2005). Molecular determinants for subcellular localization of hepatitis C virus core protein. *J Virol* 79, 1271-1281.
- Swaminathan, G., and Tsygankov, A.Y. (2006). The Cbl family proteins: ring leaders in regulation of cell signaling. *J Cell Physiol* 209, 21-43.
- Syder, A.J., Lee, H., Zeisel, M.B., Grove, J., Soulier, E., Macdonald, J., Chow, S., Chang, J., Baumert, T.F., McKeating, J.A., *et al.* (2011). Small molecule scavenger receptor BI antagonists are potent HCV entry inhibitors. *J Hepatol* 54, 48-55.
- Tai, A.W., and Chung, R.T. (2009). Treatment failure in hepatitis C: mechanisms of non-response. *J Hepatol* 50, 412-420.
- Takaki, A., Wiese, M., Maertens, G., Depla, E., Seifert, U., Liebetrau, A., Miller, J.L., Manns, M.P., and Rehermann, B. (2000). Cellular immune responses persist and humoral responses

- decrease two decades after recovery from a single-source outbreak of hepatitis C. *Nat Med* 6, 578-582.
- Taliani, G., Gemignani, G., Ferrari, C., Aceti, A., Bartolozzi, D., Blanc, P.L., Capanni, M., Esperti, F., Forte, P., Guadagnino, V., *et al.* (2006). Pegylated interferon alfa-2b plus ribavirin in the retreatment of interferon-ribavirin nonresponder patients. *Gastroenterology* 130, 1098-1106.
- Tan, S.L., and Katze, M.G. (2001). How hepatitis C virus counteracts the interferon response: the jury is still out on NS5A. *Virology* 284, 1-12.
- Tan, S.L., Nakao, H., He, Y., Vijaysri, S., Neddermann, P., Jacobs, B.L., Mayer, B.J., and Katze, M.G. (1999). NS5A, a nonstructural protein of hepatitis C virus, binds growth factor receptor-bound protein 2 adaptor protein in a Src homology 3 domain/ligand-dependent manner and perturbs mitogenic signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 5533-5538.
- Tanaka, M., Kamata, R., and Sakai, R. (2005). EphA2 phosphorylates the cytoplasmic tail of Claudin-4 and mediates paracellular permeability. *J Biol Chem* 280, 42375-42382.
- Tanaka, T., Kato, N., Cho, M.J., Sugiyama, K., and Shimotohno, K. (1996). Structure of the 3' terminus of the hepatitis C virus genome. *J Virol* 70, 3307-3312.
- Taub, R. (2004). Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 836-847.
- Tedbury, P., Welbourn, S., Pause, A., King, B., Griffin, S., and Harris, M. (2011). The subcellular localization of the hepatitis C virus non-structural protein NS2 is regulated by an ion channel-independent function of the p7 protein. *J Gen Virol* 92, 819-830.
- Tellinghuisen, T.L., Foss, K.L., and Treadaway, J. (2008a). Regulation of hepatitis C virion production via phosphorylation of the NS5A protein. *PLoS Pathog* 4, e1000032.
- Tellinghuisen, T.L., Foss, K.L., Treadaway, J.C., and Rice, C.M. (2008b). Identification of residues required for RNA replication in domains II and III of the hepatitis C virus NS5A protein. *J Virol* 82, 1073-1083.
- Tellinghuisen, T.L., Marcotrigiano, J., Gorbalenya, A.E., and Rice, C.M. (2004). The NS5A protein of hepatitis C virus is a zinc metalloprotein. *J Biol Chem* 279, 48576-48587.
- Tellinghuisen, T.L., Marcotrigiano, J., and Rice, C.M. (2005). Structure of the zinc-binding domain of an essential component of the hepatitis C virus replicase. *Nature* 435, 374-379.
- Thomas, D., and Zoulim, F. (2012). New challenges in viral hepatitis. *Gut* 61 Suppl 1, i1-5.
- Thomas, D.L. (2010). Curing hepatitis C with pills: a step toward global control. *Lancet* 376, 1441-1442.
- Thoresen, G.H., Guren, T.K., Sandnes, D., Peak, M., Agius, L., and Christoffersen, T. (1998). Response to transforming growth factor alpha (TGFalpha) and epidermal growth factor (EGF) in hepatocytes: lower EGF receptor affinity of TGFalpha is associated with more sustained

activation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase and greater efficacy in stimulation of DNA synthesis. *J Cell Physiol* 175, 10-18.

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

Tong, Y., Zhu, Y., Xia, X., Liu, Y., Feng, Y., Hua, X., Chen, Z., Ding, H., Gao, L., Wang, Y., *et al.* (2011). Tupaia CD81, SR-BI, claudin-1, and occludin support hepatitis C virus infection. *J Virol* 85, 2793-2802.

Triyatni, M., Saunier, B., Maruvada, P., Davis, A.R., Ulianich, L., Heller, T., Patel, A., Kohn, L.D., and Liang, T.J. (2002). Interaction of hepatitis C virus-like particles and cells: a model system for studying viral binding and entry. *J Virol* 76, 9335-9344.

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

Tuzi, N.L., and Gullick, W.J. (1994). eph, the largest known family of putative growth factor receptors. *Br J Cancer* 69, 417-421.

Ullrich, A., Coussens, L., Hayflick, J.S., Dull, T.J., Gray, A., Tam, A.W., Lee, J., Yarden, Y., Libermann, T.A., Schlessinger, J., *et al.* (1984). Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature* 309, 418-425.

van Kooyk, Y., and Geijtenbeek, T.B. (2003). DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. *Nat Rev Immunol* 3, 697-709.

Vanneman, M., and Dranoff, G. (2012). Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment. *Nat Rev Cancer* 12, 237-251.

Vanwolleghem, T., Bukh, J., Meuleman, P., Desombere, I., Meunier, J.C., Alter, H., Purcell, R.H., and Leroux-Roels, G. (2008). Polyclonal immunoglobulins from a chronic hepatitis C virus patient protect human liver-chimeric mice from infection with a homologous hepatitis C virus strain. *Hepatology* 47, 1846-1855.

Varaklioti, A., Vassilaki, N., Georgopoulou, U., and Mavromara, P. (2002). Alternate translation occurs within the core coding region of the hepatitis C viral genome. *J Biol Chem* 277, 17713-17721.

- Vetter, I.R., and Wittinghofer, A. (2001). The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* 294, 1299-1304.
- Vieira, A.V., Lamaze, C., and Schmid, S.L. (1996). Control of EGF receptor signaling by clathrin-mediated endocytosis. *Science* 274, 2086-2089.
- Vivanco, I., and Sawyers, C.L. (2002). The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2, 489-501.
- Voisset, C., Callens, N., Blanchard, E., Op De Beeck, A., Dubuisson, J., and Vu-Dac, N. (2005). High density lipoproteins facilitate hepatitis C virus entry through the scavenger receptor class B type I. *J Biol Chem* 280, 7793-7799.
- Voisset, C., Op de Beeck, A., Horellou, P., Dreux, M., Gustot, T., Duverlie, G., Cosset, F.L., Vu-Dac, N., and Dubuisson, J. (2006). High-density lipoproteins reduce the neutralizing effect of hepatitis C virus (HCV)-infected patient antibodies by promoting HCV entry. *J Gen Virol* 87, 2577-2581.
- Volk, M.L., Tocco, R., Saini, S., and Lok, A.S. (2009). Public health impact of antiviral therapy for hepatitis C in the United States. *Hepatology* 50, 1750-1755.
- von Hahn, T., Lindenbach, B.D., Boullier, A., Quehenberger, O., Paulson, M., Rice, C.M., and McKeating, J.A. (2006). Oxidized low-density lipoprotein inhibits hepatitis C virus cell entry in human hepatoma cells. *Hepatology* 43, 932-942.
- von Hahn, T., and Rice, C.M. (2008). Hepatitis C virus entry. *J Biol Chem* 283, 3689-3693.
- von Hahn, T., Yoon, J.C., Alter, H., Rice, C.M., Rehmann, B., Balfe, P., and McKeating, J.A. (2007). Hepatitis C virus continuously escapes from neutralizing antibody and T-cell responses during chronic infection in vivo. *Gastroenterology* 132, 667-678.
- Wada, T., Joza, N., Cheng, H.Y., Sasaki, T., Koziaradzki, I., Bachmaier, K., Katada, T., Schreiber, M., Wagner, E.F., Nishina, H., *et al.* (2004). MKK7 couples stress signalling to G2/M cell-cycle progression and cellular senescence. *Nat Cell Biol* 6, 215-226.
- Wagner, E.F., and Nebreda, A.R. (2009). Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat Rev Cancer* 9, 537-549.
- Wahid, A., Helle, F., Descamps, V., Duverlie, G., Penin, F., and Dubuisson, J. (2012). Disulfide Bonds in Hepatitis C Virus Glycoprotein E1 Control the Assembly and Entry Functions of E2 Glycoprotein. *J Virol*.
- Wakita, T., Pietschmann, T., Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., Murthy, K., Habermann, A., Krausslich, H.G., Mizokami, M., *et al.* (2005). Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 11, 791-796.

- Walewski, J.L., Keller, T.R., Stump, D.D., and Branch, A.D. (2001). Evidence for a new hepatitis C virus antigen encoded in an overlapping reading frame. *RNA* 7, 710-721.
- Walker-Daniels, J., Riese, D.J., 2nd, and Kinch, M.S. (2002). c-Cbl-dependent EphA2 protein degradation is induced by ligand binding. *Mol Cancer Res* 1, 79-87.
- Wang, C., Sarnow, P., and Siddiqui, A. (1993). Translation of human hepatitis C virus RNA in cultured cells is mediated by an internal ribosome-binding mechanism. *J Virol* 67, 3338-3344.
- Wang, L., and Boyer, J.L. (2004). The maintenance and generation of membrane polarity in hepatocytes. *Hepatology* 39, 892-899.
- Washburn, M.L., Bility, M.T., Zhang, L., Kovalev, G.I., Buntzman, A., Frelinger, J.A., Barry, W., Ploss, A., Rice, C.M., and Su, L. (2011). A humanized mouse model to study hepatitis C virus infection, immune response, and liver disease. *Gastroenterology* 140, 1334-1344.
- Watt, K., Veldt, B., and Charlton, M. (2009). A practical guide to the management of HCV infection following liver transplantation. *Am J Transplant* 9, 1707-1713.
- Weiner, A.J., Brauer, M.J., Rosenblatt, J., Richman, K.H., Tung, J., Crawford, K., Bonino, F., Saracco, G., Choo, Q.L., Houghton, M., *et al.* (1991). Variable and hypervariable domains are found in the regions of HCV corresponding to the flavivirus envelope and NS1 proteins and the pestivirus envelope glycoproteins. *Virology* 180, 842-848.
- Wellnitz, S., Klumpp, B., Barth, H., Ito, S., Depla, E., Dubuisson, J., Blum, H.E., and Baumert, T.F. (2002). Binding of hepatitis C virus-like particles derived from infectious clone H77C to defined human cell lines. *J Virol* 76, 1181-1193.
- Weston, C.R., and Davis, R.J. (2007). The JNK signal transduction pathway. *Curr Opin Cell Biol* 19, 142-149.
- Wilkins, C., Woodward, J., Lau, D.T., Barnes, A., Joyce, M., McFarlane, N., Tyrrell, D.L., and Gale, M., Jr. (2012). IFITM1 is a tight junction protein that inhibits hepatitis C virus entry. *Hepatology*.
- Williamson, M.P. (1994). The structure and function of proline-rich regions in proteins. *Biochem J* 297 ( Pt 2), 249-260.
- Witteveldt, J., Evans, M.J., Bitzegeio, J., Koutsoudakis, G., Owsianka, A.M., Angus, A.G., Keck, Z.Y., Fong, S.K., Pietschmann, T., Rice, C.M., *et al.* (2009). CD81 is dispensable for hepatitis C virus cell-to-cell transmission in hepatoma cells. *J Gen Virol* 90, 48-58.
- Wolf, M., Dimitrova, M., Baumert, T.F., and Schuster, C. (2008). The major form of hepatitis C virus alternate reading frame protein is suppressed by core protein expression. *Nucleic Acids Res* 36, 3054-3064.

- Wong-Staal, F., Syder, A.J., and McKelvy, J.F. (2010). Targeting HCV entry for development of therapeutics. *Viruses* 2, 1718-1733.
- Wood, E.R., Truesdale, A.T., McDonald, O.B., Yuan, D., Hassell, A., Dickerson, S.H., Ellis, B., Pennisi, C., Horne, E., Lackey, K., *et al.* (2004). A unique structure for epidermal growth factor receptor bound to GW572016 (Lapatinib): relationships among protein conformation, inhibitor off-rate, and receptor activity in tumor cells. *Cancer Res* 64, 6652-6659.
- Wu, Y., Liao, Q., Yang, R., and Chen, X. (2011). A novel luciferase and GFP dual reporter virus for rapid and convenient evaluation of hepatitis C virus replication. *Virus Res* 155, 406-414.
- Wunschmann, S., Medh, J.D., Klinzmann, D., Schmidt, W.N., and Stapleton, J.T. (2000). Characterization of hepatitis C virus (HCV) and HCV E2 interactions with CD81 and the low-density lipoprotein receptor. *J Virol* 74, 10055-10062.
- Wustner, D., Mondal, M., Huang, A., and Maxfield, F.R. (2004). Different transport routes for high density lipoprotein and its associated free sterol in polarized hepatic cells. *J Lipid Res* 45, 427-437.
- Xu, Z., Choi, J., Lu, W., and Ou, J.H. (2003). Hepatitis C virus f protein is a short-lived protein associated with the endoplasmic reticulum. *J Virol* 77, 1578-1583.
- Yaffe, M.B. (2002). Phosphotyrosine-binding domains in signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 177-186.
- Yamaga, A.K., and Ou, J.H. (2002). Membrane topology of the hepatitis C virus NS2 protein. *J Biol Chem* 277, 33228-33234.
- Yang, W., Qiu, C., Biswas, N., Jin, J., Watkins, S.C., Montelaro, R.C., Coyne, C.B., and Wang, T. (2008). Correlation of the tight junction-like distribution of Claudin-1 to the cellular tropism of hepatitis C virus. *J Biol Chem* 283, 8643-8653.
- Yarden, Y., and Sliwkowski, M.X. (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 127-137.
- Yoshida, T., Hanada, T., Tokuhisa, T., Kosai, K., Sata, M., Kohara, M., and Yoshimura, A. (2002). Activation of STAT3 by the hepatitis C virus core protein leads to cellular transformation. *J Exp Med* 196, 641-653.
- Yu, G.Y., Lee, K.J., Gao, L., and Lai, M.M. (2006). Palmitoylation and polymerization of hepatitis C virus NS4B protein. *J Virol* 80, 6013-6023.



- Yu, J., Wjasow, C., and Backer, J.M. (1998). Regulation of the p85/p110alpha phosphatidylinositol 3'-kinase. Distinct roles for the n-terminal and c-terminal SH2 domains. *J Biol Chem* 273, 30199-30203.
- Yu, L. (2008). The structure and function of Niemann-Pick C1-like 1 protein. *Curr Opin Lipidol* 19, 263-269.
- Yun, C.H., Boggon, T.J., Li, Y., Woo, M.S., Greulich, H., Meyerson, M., and Eck, M.J. (2007). Structures of lung cancer-derived EGFR mutants and inhibitor complexes: mechanism of activation and insights into differential inhibitor sensitivity. *Cancer Cell* 11, 217-227.
- Zahid, M.N., Turek, M., Xiao, F., Thi, V.L., Guerin, M., Fofana, I., Bachellier, P., Thompson, J., Delang, L., Neyts, J., *et al.* (2012). The post-binding activity of scavenger receptor BI mediates initiation of hepatitis C virus infection and viral dissemination. *Hepatology*.
- Zein, N.N. (2000). Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *Clin Microbiol Rev* 13, 223-235.
- Zeisel, M.B., Cosset, F.L., and Baumert, T.F. (2008). Host neutralizing responses and pathogenesis of hepatitis C virus infection. *Hepatology* 48, 299-307.
- Zeisel, M.B., Da Costa, D., and Baumert, T.F. (2011a). Opening the door for hepatitis C virus infection in genetically humanized mice. *Hepatology* 54, 1873-1875.
- Zeisel, M.B., Fafi-Kremer, S., Fofana, I., Barth, H., Stoll-Keller, F., Doffoel, M., and Baumert, T.F. (2007a). Neutralizing antibodies in hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol* 13, 4824-4830.
- Zeisel, M.B., Fofana, I., Fafi-Kremer, S., and Baumert, T.F. (2011b). Hepatitis C virus entry into hepatocytes: molecular mechanisms and targets for antiviral therapies. *J Hepatol* 54, 566-576.
- Zeisel, M.B., Koutsoudakis, G., Schnober, E.K., Haberstroh, A., Blum, H.E., Cosset, F.L., Wakita, T., Jaeck, D., Doffoel, M., Royer, C., *et al.* (2007b). Scavenger receptor class B type I is a key host factor for hepatitis C virus infection required for an entry step closely linked to CD81. *Hepatology* 46, 1722-1731.
- Zeisel, M.B., Lupberger, J., Fofana, I., and Baumert, T.F. (2012). Host-targeting agents for prevention and treatment of chronic hepatitis C - Perspectives and challenges. *J Hepatol*.
- Zhang, J., Randall, G., Higginbottom, A., Monk, P., Rice, C.M., and McKeating, J.A. (2004). CD81 is required for hepatitis C virus glycoprotein-mediated viral infection. *J Virol* 78, 1448-1455.

- Zhang, X.A., Lane, W.S., Charrin, S., Rubinstein, E., and Liu, L. (2003). EWI2/PGRL associates with the metastasis suppressor KAI1/CD82 and inhibits the migration of prostate cancer cells. *Cancer Res* 63, 2665-2674.
- Zhang, Y.Y., Zhang, B.H., Ishii, K., and Liang, T.J. (2010). Novel function of CD81 in controlling hepatitis C virus replication. *J Virol* 84, 3396-3407.
- Zhao, X., Tang, Z.Y., Klumpp, B., Wolff-Vorbeck, G., Barth, H., Levy, S., von Weizsacker, F., Blum, H.E., and Baumert, T.F. (2002). Primary hepatocytes of *Tupaia belangeri* as a potential model for hepatitis C virus infection. *J Clin Invest* 109, 221-232.
- Zheng, A., Yuan, F., Li, Y., Zhu, F., Hou, P., Li, J., Song, X., Ding, M., and Deng, H. (2007). Claudin-6 and claudin-9 function as additional coreceptors for hepatitis C virus. *J Virol* 81, 12465-12471.
- Zhong, J., Gastaminza, P., Cheng, G., Kapadia, S., Kato, T., Burton, D.R., Wieland, S.F., Uprichard, S.L., Wakita, T., and Chisari, F.V. (2005). Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 9294-9299.

**ANNEXE**

**Publication n°1:** EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy.

Lupberger J\*, Zeisel M.B\*, Xiao F, Thumann C, Fofana I, **Zona L**, Davis C, Mee CJ, Turek M, Gorke S, Royer C, Fischer B, Zahid MN, Lavillette D, Fresquet J, Cosset FL, Rothenberg SM, Pietschmann T, Patel AH, Pessaux P, Dozzoël M, Raffelsberger W, Poch O, McKeating JA, Brino L, Baumert TF. (\* contribution équivalente).

*Nature Medicine*, 2011, volume 5, pages 589 à 595.

# EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy

Joachim Lupberger<sup>1,2,13</sup>, Mirjam B Zeisel<sup>1,2,13</sup>, Fei Xiao<sup>1,2</sup>, Christine Thumann<sup>1,2</sup>, Isabel Fofana<sup>1,2</sup>, Laetitia Zona<sup>1,2</sup>, Christopher Davis<sup>3</sup>, Christopher J Mee<sup>3</sup>, Marine Turek<sup>1,2</sup>, Sebastian Gorke<sup>4</sup>, Cathy Royer<sup>1,2</sup>, Benoit Fischer<sup>5</sup>, Muhammad N Zahid<sup>1,2</sup>, Dimitri Lavillette<sup>6</sup>, Judith Fresquet<sup>6</sup>, François-Loïc Cosset<sup>6</sup>, S Michael Rothenberg<sup>7</sup>, Thomas Pietschmann<sup>8</sup>, Arvind H Patel<sup>9</sup>, Patrick Pessaux<sup>10</sup>, Michel Doffoël<sup>11</sup>, Wolfgang Raffelsberger<sup>12</sup>, Olivier Poch<sup>12</sup>, Jane A McKeating<sup>3</sup>, Laurent Brino<sup>5</sup> & Thomas F Baumert<sup>1,2,11</sup>

**Hepatitis C virus (HCV) is a major cause of liver disease, but therapeutic options are limited and there are no prevention strategies. Viral entry is the first step of infection and requires the cooperative interaction of several host cell factors. Using**

**a functional RNAi kinase screen, we identified epidermal growth factor receptor and ephrin receptor A2 as host cofactors for HCV entry. Blocking receptor kinase activity by approved inhibitors broadly impaired infection by all major HCV genotypes and viral escape variants in cell culture and in a human liver chimeric mouse model *in vivo*. The identified receptor tyrosine kinases (RTKs) mediate HCV entry by regulating CD81–claudin-1 co-receptor associations and viral glycoprotein–dependent membrane fusion. These results identify RTKs as previously unknown HCV entry cofactors and show that tyrosine kinase inhibitors have substantial antiviral activity. Inhibition of RTK function may constitute a new approach for prevention and treatment of HCV infection.**

HCV is a major cause of liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Current antiviral treatment is limited by drug resistance, toxicity and high costs<sup>1</sup>. Although newly developed antiviral substances targeting HCV protein processing have been shown to improve virological response, toxicity and resistance remain major challenges<sup>2</sup>. Thus, new antiviral preventive and therapeutic strategies are urgently needed. Because HCV entry is required for initiation, dissemination and maintenance of viral infection, it is a promising target for antiviral therapy<sup>3,4</sup>.

HCV entry is a multistep process involving viral envelope glycoproteins as well as several cellular attachment and entry factors<sup>5</sup>. Attachment of the virus to the target cell is mediated through binding of HCV envelope glycoproteins to glycosaminoglycans<sup>6</sup>. HCV is internalized in a clathrin-dependent endocytic process requiring CD81 (ref. 7), scavenger receptor type B class I (SR-BI)<sup>8</sup>, claudin-1 (CLDN1)<sup>9</sup> and occludin (OCLN)<sup>10</sup>. To elucidate the functional role of host cell kinases within the HCV entry process, we performed a functional RNAi screen.

## RESULTS

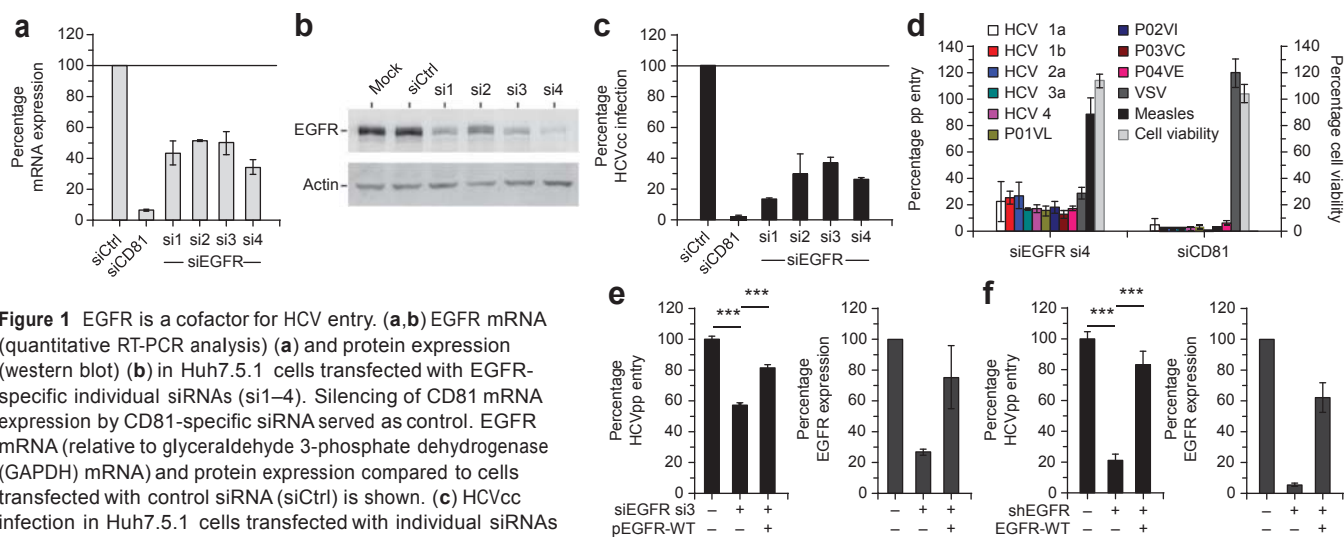
### Host cell kinases are host cofactors for HCV entry

Using a siRNA screen, we identified a network of kinases with functional impact on HCV entry (**Supplementary Results, Supplementary Tables 1 and 2 and Supplementary Figs. 1 and 2**). To study the relevance of the identified kinases on the HCV life cycle, we further validated and characterized the functional impact of epidermal growth factor receptor (EGFR), ephrin receptor A2 (EphA2) and cell division cycle 2 kinase (CDC2) (**Supplementary Results and Supplementary Fig. 3**) on HCV entry. We focused on EGFR and EphA2 because they are key components in the identified networks (**Supplementary Fig. 2c**), they are highly expressed in human liver (**Supplementary Table 2**) and their kinase function is inhibited by clinically approved protein kinase inhibitors (PKIs)<sup>11–13</sup>, allowing us to explore the potential of these molecules as therapeutic targets.

Using individual siRNAs, we first confirmed that silencing of mRNAs reduced EGFR and EphA2 mRNA and protein expression (**Fig. 1a,b and Supplementary Fig. 4a,b**). Infection of siEGFR or

<sup>1</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U748, Strasbourg, France. <sup>2</sup>Université de Strasbourg, Strasbourg, France. <sup>3</sup>Hepatitis C Research Group, Division of Immunity and Infection, University of Birmingham, Birmingham, UK. <sup>4</sup>Department of Medicine II, University of Freiburg, Freiburg, Germany. <sup>5</sup>High-Throughput Screening Platform, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U964/Centre National de la Recherche Scientifique UMR1704/Université de Strasbourg, Illkirch, France. <sup>6</sup>Université de Lyon, Université Claude Bernard-Lyon 1, Institut Fédératif de Recherche 128, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U758, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Lyon, France. <sup>7</sup>Massachusetts General Hospital Cancer Center, Howard Hughes Medical Institute and Harvard Medical School, Charlestown, Massachusetts, USA. <sup>8</sup>Division of Experimental Virology, TWINCORE, Centre for Experimental and Clinical Infection Research, Hanover, Germany. <sup>9</sup>Medical Research Council–University of Glasgow Centre for Virus Research, Glasgow, UK. <sup>10</sup>Pôle des Pathologies Digestives, Hépatiques et Transplantation, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France. <sup>11</sup>Pôle Hépatodigestif, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France. <sup>12</sup>Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U964/Centre National de la Recherche Scientifique UMR7104 /Université de Strasbourg, Illkirch, France. <sup>13</sup>These authors contributed equally to this work. Correspondence should be addressed to T.F.B. (thomas.baumert@unistra.fr).

Received 7 December 2010; accepted 3 March 2011; published online 24 April 2011; doi:10.1038/nm.2341



**Figure 1** EGFR is a cofactor for HCV entry. **(a,b)** EGFR mRNA (quantitative RT-PCR analysis) **(a)** and protein expression (western blot) **(b)** in Huh7.5.1 cells transfected with EGFR-specific individual siRNAs (si1–4). Silencing of CD81 mRNA expression by CD81-specific siRNA served as control. EGFR mRNA (relative to glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA) and protein expression compared to cells transfected with control siRNA (siCtrl) is shown. **(c)** HCVcc infection in Huh7.5.1 cells transfected with individual siRNAs shown in **a** and **b**. siCtrl and CD81-specific siRNA served as internal controls. Data are expressed as percentage HCVcc infection relative to siCtrl-transfected cells (means  $\pm$  s.d. from three independent experiments in triplicate). **(d)** Entry of HCVpp containing envelope glycoproteins of various isolates<sup>14,39</sup> in Huh7.5.1 cells transfected with si4. Vesicular stomatitis virus (VSV) and measles virus pseudoparticle (pp) entry or cells transfected with CD81-specific siRNA served as controls. Data are expressed as percentage pseudoparticle entry relative to siCtrl-transfected cells (means  $\pm$  s.d. from three independent experiments in triplicate). **(e)** HCVpp entry and EGFR protein expression in Huh7.5.1 cells concurrently transfected with EGFR-specific individual si3 and a cDNA encoding RNAi-resistant EGFR (pEGFR-WT)<sup>40</sup>. **(f)** HCVpp entry and EGFR protein expression in PHHs concurrently transfected with lentiviruses expressing shEGFR and wild-type EGFR cDNA (EGFR-WT)<sup>40</sup>. Data are expressed as percentage HCVpp entry relative to Ctrl cells or as percentage EGFR expression normalized for  $\beta$ -actin expression (means  $\pm$  s.d. from four independent experiments in triplicate). \*\*\* $P < 0.0005$ .

siEphA2-treated cells by cell culture–derived HCV (HCVcc) was markedly reduced, as compared to control siRNA-treated cells indicating that both EGFR and EphA2 are involved in the initiation of a productive infection (Fig. 1c and Supplementary Fig. 4c). Silencing of kinase expression inhibited the entry of HCV pseudoparticles (HCVpp) derived from major genotypes, including highly diverse HCV strains<sup>14</sup> (Fig. 1d and Supplementary Fig. 4d). The effects of silencing of endogenous EGFR or EphA2 on HCV infection were rescued by RNAi-resistant ectopic expression of wild-type EGFR or EphA2 (Fig. 1e,f and Supplementary Fig. 4e,f), largely excluding the possibility of off-target effects causing the observed phenotype. Furthermore, silencing and rescue experiments using well-characterized lentiviral vectors expressing EGFR-specific shRNA showed a key role for EGFR in HCV entry into primary human hepatocytes (PHHs) (Fig. 1f). We then assessed the functional impact of EGFR as a cofactor for HCV entry by expressing human EGFR in mouse hepatoma cell lines engineered to express the four human entry factors CD81, SR-BI, CLDN1 and OCLN (AML12 4R; Supplementary Fig. 5). Cell surface expression of human EGFR in AML12 4R cells markedly enhanced the susceptibility of mouse cells to HCVpp entry (Supplementary Fig. 5).

**RTK kinase function is relevant for HCV entry**

We used PKIs to further study the functional relevance of the identified kinases for HCV entry and infection. Erlotinib (an EGFR inhibitor) and dasatinib (an EphA2 inhibitor) impaired HCV entry and infection in a dose-dependent manner without a detectable effect on replication of the corresponding subgenomic replicon (Fig. 2, Supplementary Fig. 6 and Supplementary Fig. 7). The half-maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) values for erlotinib and dasatinib to block HCVpp entry (erlotinib, 0.45  $\pm$  0.09  $\mu$ M; dasatinib, 0.53  $\pm$  0.02  $\mu$ M) and HCVcc infection (erlotinib, 0.53  $\pm$  0.08  $\mu$ M; dasatinib, 0.50  $\pm$  0.30  $\mu$ M) of human hepatoma Huh7.5.1 cells were comparable (Fig. 2a and

Supplementary Fig. 7a,b). These data indicate that inhibiting RTKs by erlotinib and dasatinib has a marked effect on HCV entry.

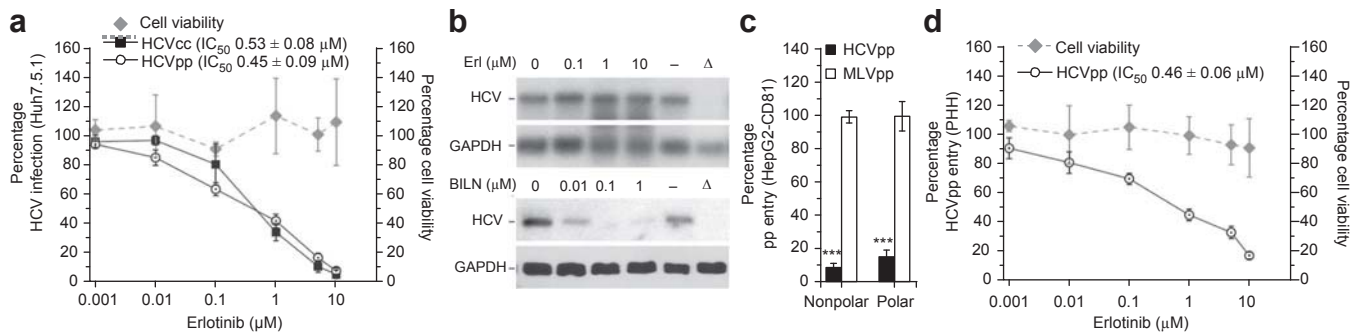
To evaluate the effects of the inhibitors on HCV entry into cells more closely resembling the HCV target cells *in vivo*, we investigated HCVpp entry into polarized HepG2-CD81 hepatoma cells<sup>15</sup> and PHHs. PKIs markedly and significantly ( $P < 0.005$ ) inhibited HCVpp entry into polarized HepG2-CD81 cells (Fig. 2c and Supplementary Fig. 7d) and PHHs (Fig. 2d and Supplementary Fig. 7e). We obtained similar results for infection of PHHs with HCVcc and serum-derived HCV (Fig. 3 and Supplementary Fig. 7), confirming the role of the kinases as auxiliary host cell cofactors in models that more closely mimic *in vivo* infection.

A specific effect of erlotinib on EGFR-mediated HCV entry was further confirmed by the inhibition of HCV entry and infection by other EGFR inhibitors. The EGFR inhibitors gefitinib and lapatinib markedly inhibited HCVpp entry and HCVcc infection in PHHs and Huh7.5.1 cells similarly to erlotinib (Fig. 2e,f). The specificity of the PKIs in preventing HCV entry was further corroborated by their lack of an effect on murine leukemia virus and measles virus entry (Fig. 2c and Supplementary Fig. 8). Moreover, PKI treatment of RTK-silenced Huh7.5.1 cells reversed the rescue of HCV entry conferred by expressing EGFR and EphA2 *in trans* (data not shown). Taken together, these results suggest that the RTK kinase function is necessary for efficient HCV entry.

**RTK-specific ligands and antibodies modulate HCV entry**

We assessed virus entry in the presence of RTK-specific ligands and antibodies. Epidermal growth factor (EGF) and transforming growth factor- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) are well-characterized EGFR ligands whose binding promotes receptor dimerization and subsequent phosphorylation of the intracytoplasmic kinase domain<sup>16</sup>. To confirm the biological activity of EGFR-specific reagents in the target cells of our HCV model systems, we first studied their effect on EGFR phosphorylation. Preincubation of PHHs with EGF markedly increased basal

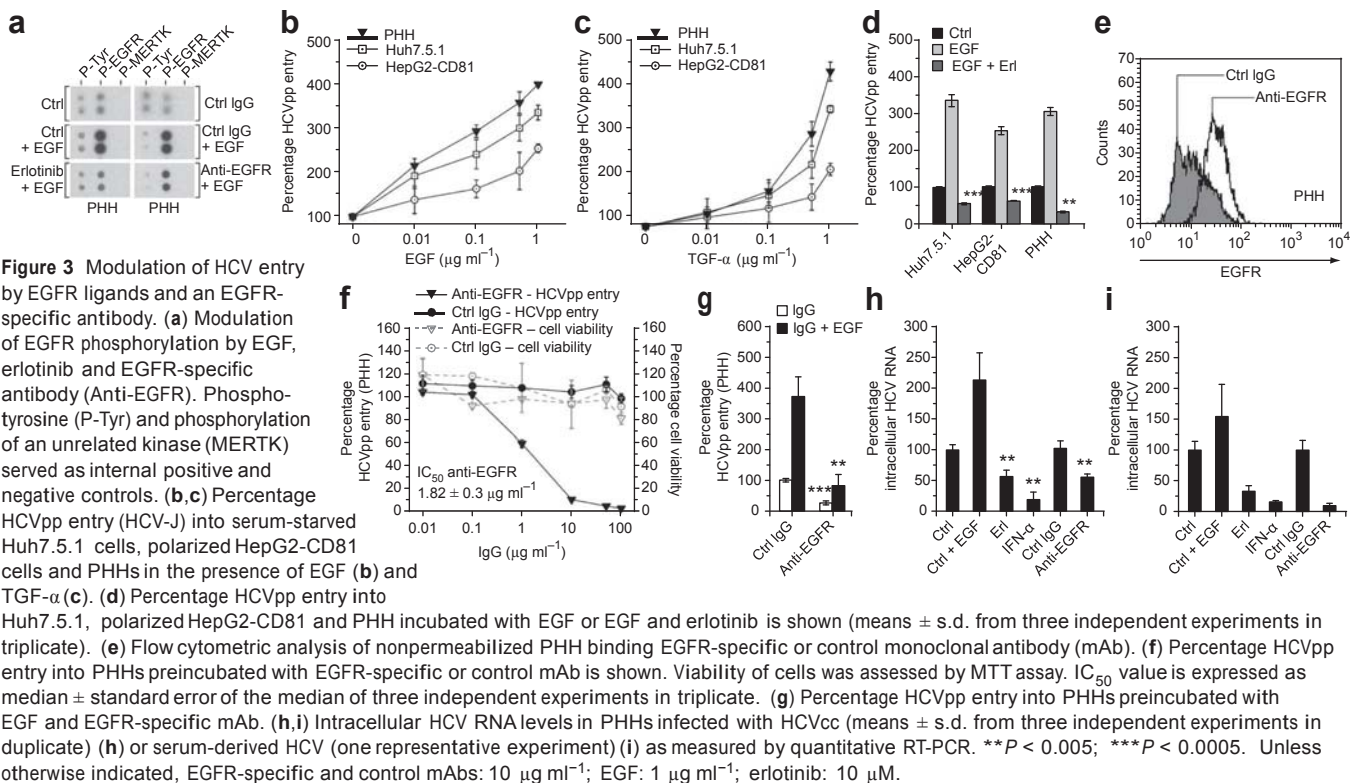




**Figure 2** Inhibition of EGFR activation by kinase inhibitors reduces HCV entry and infection. **(a)** Effect of erlotinib on HCV entry and infection in Huh7.5.1 cells. HCVcc (Luc-Jc1; J6-JFH1) infection and HCVpp (J6) entry in Huh7.5.1 cells preincubated with the indicated concentrations of erlotinib are shown. Data are expressed as percentage HCVcc infection or HCVpp entry relative to solvent DMSO-treated control cells (means  $\pm$  s.e.m. from three independent experiments in triplicate). **(b)** Northern blot analysis of HCV RNA and GAPDH mRNA in Huh7.5 cells electroporated with RNA from subgenomic HCV JFH1 replicon and incubated with solvent Ctrl, HCV protease inhibitor BILN-2061 or erlotinib (Erl) is shown. Analysis of HCV RNA in cells transfected with replication incompetent HCV RNA (GND,  $\Delta$ ) served as negative control. **(c)** Effect of erlotinib on HCVpp and MLVpp entry in HepG2-CD81 cells. The percentage pseudoparticle entry into nonpolarized and polarized HepG2-CD81 cells (generated as previously described<sup>15</sup>) preincubated with erlotinib (10  $\mu$ M) is shown (means  $\pm$  s.d. from ten independent experiments). **(d)** Effect of erlotinib on HCVpp entry into PHHs. The percentage HCVpp entry into PHHs preincubated with erlotinib is shown relative to entry into solvent-treated control cells. IC<sub>50</sub> value is expressed as median  $\pm$  standard error of the median of three independent experiments performed in triplicate. **(e,f)** HCVpp entry into PHHs **(e)** and HCVcc infection of Huh7.5.1 cells **(f)** preincubated with 1  $\mu$ M erlotinib, gefitinib (Gef), lapatinib (Lap), blebbistatin (Bleb) or wortmannin (Wort) is shown. Cell viability was assessed by MTT assay. Means  $\pm$  s.d. from three independent experiments in duplicate **(e)** or triplicate **(f)** are shown. \*\**P* < 0.005; \*\*\**P* < 0.0005.

levels of EGFR phosphorylation (**Fig. 3a**). In contrast, EGF had no effect on the phosphorylation of c-mer protooncogene tyrosine kinase (MERTK), an unrelated kinase (**Fig. 3a**). EGF-induced enhancement of basal EGFR phosphorylation was markedly inhibited by erlotinib and an EGFR-specific antibody (**Fig. 3a**), indicating their specific effect on EGFR phosphorylation and activation.

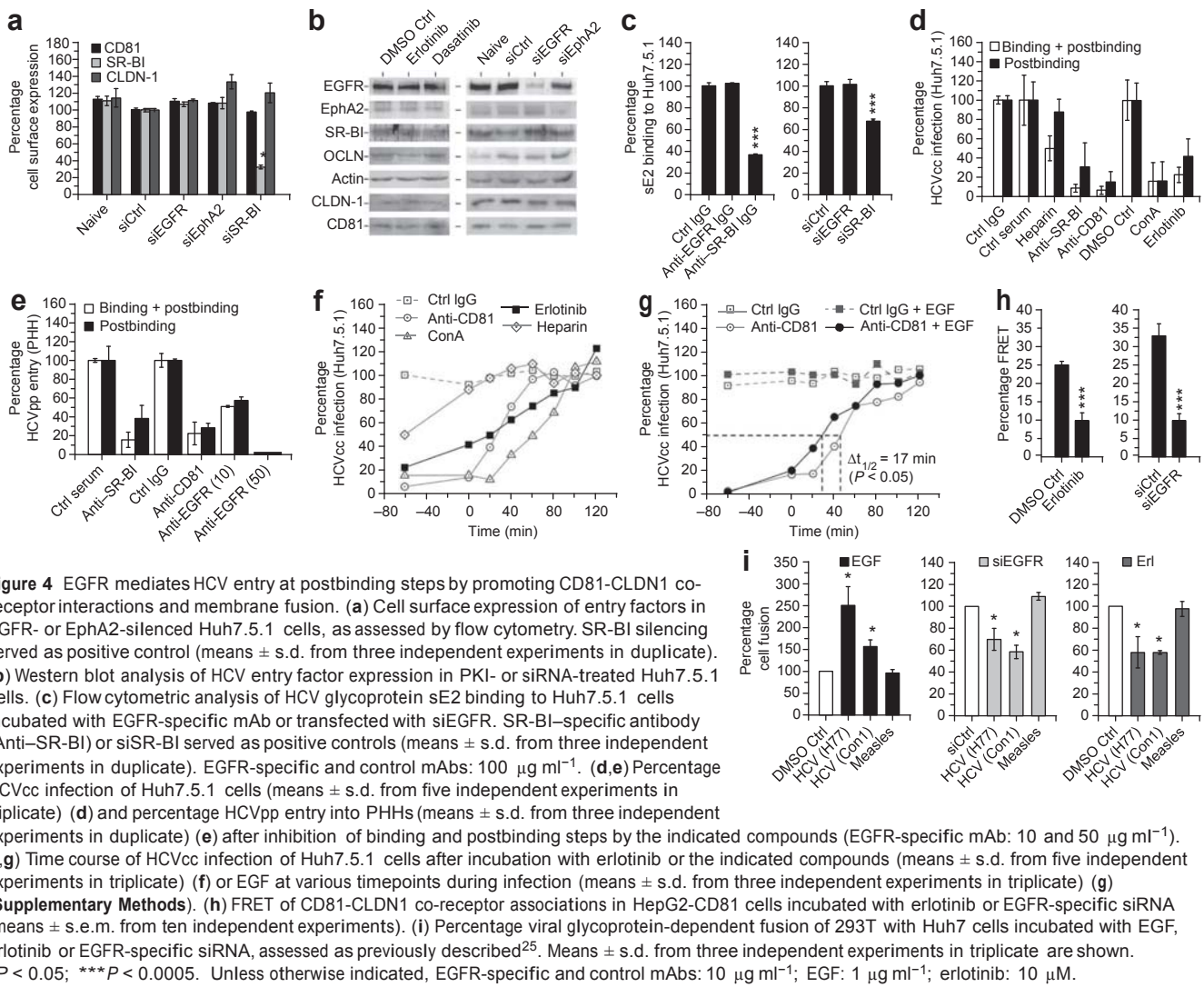
We next examined the role of EGFR ligands on HCV entry. Binding of EGF and TGF- $\alpha$  markedly enhanced entry of HCVpp into



**Figure 3** Modulation of HCV entry by EGFR ligands and an EGFR-specific antibody. **(a)** Modulation of EGFR phosphorylation by EGF, erlotinib and EGFR-specific antibody (Anti-EGFR). Phosphotyrosine (P-Tyr) and phosphorylation of an unrelated kinase (MERTK) served as internal positive and negative controls. **(b,c)** Percentage HCVpp entry (HCV-J) into serum-starved Huh7.5.1 cells, polarized HepG2-CD81 cells and PHHs in the presence of EGF **(b)** and TGF- $\alpha$  **(c)**. **(d)** Percentage HCVpp entry into Huh7.5.1, polarized HepG2-CD81 and PHH incubated with EGF or EGF and erlotinib is shown (means  $\pm$  s.d. from three independent experiments in triplicate). **(e)** Flow cytometric analysis of nonpermeabilized PHH binding EGFR-specific or control monoclonal antibody (mAb). **(f)** Percentage HCVpp entry into PHHs preincubated with EGFR-specific or control mAb is shown. Viability of cells was assessed by MTT assay. IC<sub>50</sub> value is expressed as median  $\pm$  standard error of the median of three independent experiments in triplicate. **(g,i)** Intracellular HCV RNA levels in PHHs infected with HCVcc (means  $\pm$  s.d. from three independent experiments in duplicate) **(h)** or serum-derived HCV (one representative experiment) **(i)** as measured by quantitative RT-PCR. \*\**P* < 0.005; \*\*\**P* < 0.0005. Unless otherwise indicated, EGFR-specific and control mAbs: 10  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>; EGF: 1  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>; erlotinib: 10  $\mu$ M.







© 2011 Nature America, Inc. All rights reserved.

serum-starved Huh7.5.1 cells, polarized HepG2-CD81 cells and PHHs (Fig. 3b,c), whereas TGF- $\beta$  had no effect (data not shown). These data suggest that direct interaction of EGF or TGF- $\alpha$  with the EGFR ligand-binding domain modulates HCV entry. The higher affinity of EGF for EGFR on hepatocytes<sup>17</sup> may explain the differences between EGF and TGF- $\alpha$  in enhancing HCVpp entry. Erlotinib, at doses used in HCV entry inhibition experiments, reversed the enhancing effects of EGF (Fig. 3d) and TGF- $\alpha$  (data not shown) on HCV entry. These data confirm that erlotinib inhibits HCV entry by modulating EGFR activity.

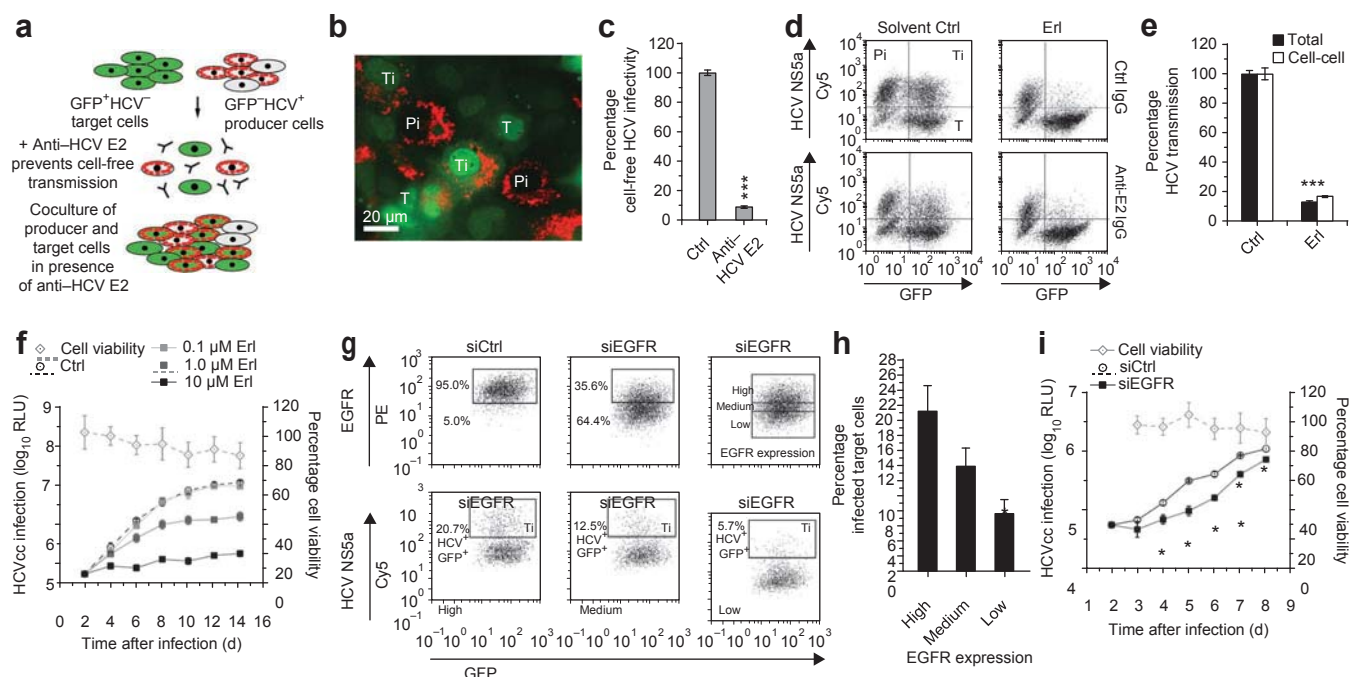
We screened a large panel of EGFR-specific antibodies and identified a monoclonal human EGFR-specific antibody that bound PHHs (Fig. 3e) and inhibited HCV entry into PHH in a dose-dependent manner (Fig. 3f), with an  $\text{IC}_{50}$  value of  $1.82 \pm 0.3 \mu\text{g ml}^{-1}$ . The antibody inhibited EGFR phosphorylation (Fig. 3a) and reversed the EGF-induced enhancement of HCV entry (Fig. 3g). Ligand-induced enhancement and EGFR-specific antibody-mediated inhibition of HCV entry were also observed for infection of PHHs with HCVcc (Fig. 3h) and with serum-derived HCV (Fig. 3i). Taken together, these results suggest that the EGFR ligand-binding domain is relevant for HCV entry. Similarly, EphA2 ligands and EphA2-specific antibodies modulated HCV entry, suggesting a functional relevance of the EphA2 ligand-binding domain for HCV entry (Supplementary Results and Supplementary Fig. 9).

**RTKs promote CD81-CLDN1 associations and membrane fusion**

To understand the mechanistic role of EGFR and EphA2 in HCV entry, we first investigated whether the RTKs regulate SR-BI, CD81, CLDN1 and OCLN expression. However, silencing RTK expression with specific siRNAs or inhibiting RTK function with PKIs had no significant effect on HCV entry factor expression (Fig. 4a,b).

Next, we aimed to fine-map the entry steps affected by the RTKs. Viral attachment is the first step of viral entry. To ascertain whether PKI-mediated inhibition of RTK function modulates HCV binding, we used a surrogate model that measures binding of the recombinant soluble form of HCV envelope glycoprotein E2 to Huh7.5.1 cells<sup>18</sup>. RTK-specific antibodies or silencing RTK expression by siRNAs had no significant effect on E2 binding of target cells, whereas preincubation with SR-BI-specific antibodies or silencing SR-BI expression markedly reduced E2 binding (Fig. 4c and Supplementary Fig. 10a). Furthermore, in contrast to the case with CD81 and SR-BI<sup>19</sup>, RTKs did not increase cellular E2 binding when expressed on the cell surface of Chinese hamster ovary cells (data not shown). These data suggest that RTKs do not modulate HCV binding to target cells.

After viral envelope binding, HCV enters its target cell in a multistep temporal process. To identify the time at which the PKIs exert their effects, we used a well-characterized assay allowing us to investigate



**Figure 5** Functional role of EGFR in viral cell-to-cell transmission and spread. **(a)** Experimental setup. HCV producer cells cultured with uninfected target cells<sup>26</sup> were incubated with siEGFR or PKIs. Cell-free HCV transmission was blocked by an E2-neutralizing antibody (Anti-HCV E2, 25  $\mu\text{g ml}^{-1}$ )<sup>26</sup>. HCV-infected target cells were quantified by flow cytometry<sup>26</sup>. **(b)** Immunofluorescence analysis of Pi (HCV RNA-electroporated Huh7.5.1 producer cells), T (GFP-expressing Huh7.5 target cells) and Ti (GFP<sup>+</sup>HCV NS5A<sup>+</sup> HCV-infected target cells) cells stained with an HCV non structural protein 5A (NS5A)-specific antibody (red). **(c)** Infectivity of Pi-T cell co-cultivation supernatants (cell-free HCV transmission). **(d, e)** Quantification of infected Ti cells during erlotinib (10  $\mu\text{M}$ ) treatment in the absence (total transmission) and presence (cell-to-cell transmission) of E2-specific antibody by flow cytometry (means  $\pm$  s.d. from three independent experiments in duplicate). **(f)** Effect of PKIs on viral spread. Long-term HCVcc infection of Huh7.5.1 cells incubated with erlotinib 48 h after infection at the indicated concentrations. Medium with solvent (Ctrl) or PKI was replenished every second day. Cell viability was assessed by MTT test. Means  $\pm$  s.d. from three independent experiments in triplicate are shown. RLU, relative light units. **(g)** EGFR expression in target cells with silenced EGFR expression. Cell surface EGFR expression was analyzed by flow cytometry and target cells were divided in three groups displaying high, medium and low EGFR expression. **(h)** HCV infection in GFP-positive target cells expressing EGFR at high, medium and low levels (see **g**) assessed as described above (means  $\pm$  s.d. from three independent experiments in triplicate). **(i)** Effect of EGFR silencing on viral spread. Long-term analysis of HCVcc infection in Huh7.5.1 cells transfected with EGFR-specific or control siRNA 24 h after infection. Cell viability was assessed by MTT test. Means  $\pm$  s.d. from three independent experiments in triplicate are shown. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.005$ ; \*\*\* $P < 0.0005$ .

whether an inhibitory molecule interferes with viral envelope binding or affects entry steps after binding of the virus to the target cell<sup>19–21</sup>. In contrast to heparin (an inhibitor of HCV binding) but similarly to CD81- and SR-BI-specific antibodies and concanamycin A (an inhibitor of endosomal acidification), PKIs inhibited HCVcc infection when added after virus binding to target cells (**Fig. 4d**). We obtained similar results for HCVpp entry into PHHs after treatment with an EGFR-specific antibody (**Fig. 4e**). These data suggest that the RTKs act at postbinding steps of viral entry.

To further elucidate the entry steps targeted by the RTKs, we performed a kinetic entry assay<sup>19,21</sup> (**Supplementary Fig. 10b**). Notably, the half-maximal times ( $t_{1/2}$ ) for erlotinib ( $t_{1/2} = 20$  min) and dasatinib ( $t_{1/2} = 26$  min) to inhibit HCV entry were similar to the half-maximal time of a CD81-specific antibody ( $t_{1/2} = 26$  min) (**Fig. 4f** and **Supplementary Fig. 10d**). Moreover, similar to concanamycin A, PKIs also had an inhibitory effect when added at late times (60–80 min) after infection (**Fig. 4** and **Supplementary Fig. 10**). We further confirmed the role of EGFR as a postbinding factor by kinetic assays under serum-free conditions. In line with previous reports<sup>22</sup>, HCV entry kinetics were delayed under serum-free conditions (**Fig. 4g**). EGF significantly ( $P < 0.05$ ) reduced the time needed for HCVcc to escape the inhibiting effects of a CD81-specific antibody in serum-starved cells from  $44 \pm 8$  min to  $27 \pm 6$  min (mean  $\pm$  s.d. of three independent experiments), suggesting that EGF markedly and

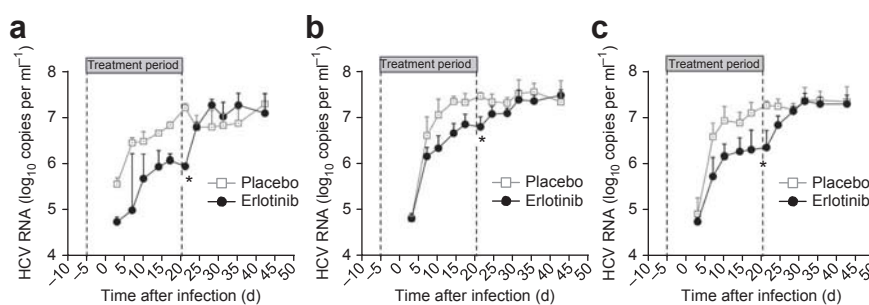
significantly ( $P < 0.05$ ) accelerates the rate of HCV entry (**Fig. 4g**). In summary, these data suggest that EGFR is required for efficient viral entry by modulating early and late steps of postbinding events.

Postbinding steps of HCV entry are mediated by the HCV entry factors SR-BI, CD81, CLDN1 and OCLN. As PKIs inhibited HCV entry at similar timepoints as a CD81-specific antibody, we investigated whether PKIs interfere with CD81-CLDN1 co-receptor interactions using a fluorescence resonance energy transfer (FRET)-based assay<sup>15,23,24</sup>. PKIs significantly ( $P < 0.0005$ ) reduced CD81-CLDN1 FRET in polarized HepG2 cells (**Fig. 4h** and **Supplementary Fig. 10e**). We obtained similar results with RTK-specific siRNAs (**Fig. 4h** and **Supplementary Fig. 10e**), confirming that the observed inhibition is RTK specific and not mediated by off-target effects of the PKIs. These results suggest that EGFR and EphA2 regulate the formation of the CD81-CLDN1 co-receptor complexes that are essential for HCV entry<sup>23</sup> and that erlotinib and dasatinib inhibit HCV entry by interfering with the CD81-CLDN1 co-receptor association.

As kinetic assays showed that PKIs inhibited late steps of viral entry (**Fig. 4f** and **Supplementary Fig. 10d**), we investigated the impact of these kinases in a viral glycoprotein-dependent cell-cell fusion assay<sup>25</sup>. Both PKIs significantly ( $P < 0.05$ ) inhibited membrane fusion of cells expressing glycoproteins derived from genotypes 1a (H77), 1b (Con1) and 2a (J6) (**Fig. 4i** and **Supplementary Fig. 10f**), whereas the EGFR ligand EGF enhanced membrane fusion of cells expressing



**Figure 6** Erlotinib modulates HCV kinetics and inhibits infection *in vivo*. Chimeric uPA-SCID mice repopulated with PHHs<sup>27,28</sup> were treated with erlotinib or placebo during infection with human-derived HCV as indicated by the bar and dashed lines. Serum HCV load was analyzed at the timepoints indicated. Results are shown as median viral load of erlotinib-treated ( $n = 4$ ) or placebo-treated control ( $n = 3$ ) mice, medians  $\pm$  standard error of the median. (a,b) Two independent studies (seven mice each) are shown. (c) Pooled data of the results shown in a and b ( $n = 14$ ), medians  $\pm$  standard error of the median; \* $P < 0.05$ .



these HCV envelope glycoproteins (Fig. 4i). In contrast, neither erlotinib nor EGF had a marked effect on the membrane fusion of cells expressing measles virus envelope glycoproteins (Fig. 4i). We obtained comparable results in EGFR- and EphA2-silenced cells (Fig. 4i, data not shown) confirming that the RTKs are involved in viral glycoprotein-dependent membrane fusion.

### Impact of RTKs in cell-to-cell transmission and viral spread

To investigate the relevance of RTK-mediated virus-host interactions for cell-to-cell transmission and viral spread, we used a cell-to-cell transmission assay<sup>26</sup> (Fig. 5a–c). Erlotinib and dasatinib significantly ( $P < 0.0005$ ) blocked HCV cell-to-cell transmission during short-term coculture experiments (24 h) (Fig. 5d–f and Supplementary Fig. 11a–c). We also observed a marked inhibition of cell-to-cell transmission when we silenced EGFR and EphA2 with specific siRNAs: infection of GFP-positive target cells directly correlated with RTK cell surface expression (Fig. 5g,h and Supplementary Fig. 11d,e). Because PKIs inhibited cell-to-cell transmission, we investigated whether erlotinib and dasatinib also impede viral spread in the HCVcc system when added after infection during long-term experiments. Both PKIs inhibited viral spread in a dose-dependent manner for up to 14 d when added 48 h after infection to HCV-infected cells (Fig. 5f and Supplementary Fig. 11c). Cell viability was not affected by long-term PKI treatment. We also observed a specific decrease in viral spread in cells with silenced RTK expression (Fig. 5i and Supplementary Fig. 11f). Taken together, these data indicate that PKIs reduce viral spread and suggest a key function of these RTKs in cell-to-cell transmission and dissemination.

### Erlotinib inhibits HCV infection *in vivo*

To address the *in vivo* relevance of the identified virus-host interactions, we assessed the effect of erlotinib on HCV infection in the chimeric urokinase plasminogen activator–severe combined immunodeficiency (uPA-SCID) mouse model<sup>27–29</sup>. Erlotinib dosing and administration was performed as described previously for cancer xenograft models<sup>30</sup> and is indicated in Figure 6. Erlotinib treatment significantly ( $P < 0.05$ ) delayed the kinetics of HCV infection (Fig. 6). The median time to reach steady-state levels of infection increased from 15 d (placebo group) to 30 d (erlotinib group) (median of pooled data from six placebo-treated and eight erlotinib-treated mice). Furthermore, erlotinib treatment decreased steady-state HCV RNA levels by more than 90% (mean of pooled data from six placebo-treated and eight erlotinib-treated mice;  $P < 0.05$ ). After discontinuation of treatment, viral load reached similar levels as in placebo-treated mice (Fig. 6). The treatment was well tolerated and did not induce any marked changes in safety parameters such as serum concentrations of alanine transaminase, albumin or body weight (data not shown). Erlotinib plasma concentrations were similar to those described previously in preclinical studies of cancer

mouse models<sup>30</sup> (data not shown). Taken together, these data suggest that EGFR acts as a cofactor for HCV entry and dissemination *in vivo* and show that erlotinib has antiviral activity *in vivo*.

### DISCUSSION

Using RNAi screening, we uncovered a network of kinases that have a functional impact on HCV entry and identified EGFR and EphA2 as previously unrecognized cofactors for HCV entry. This identification of kinases as HCV entry factors advances knowledge on the molecular mechanisms and cellular requirements of HCV entry, and the discovery of PKIs as candidate antivirals defines a potential new strategy for preventing and treating HCV infection.

EGFR is a RTK that regulates a number of key processes, including cell proliferation, survival, differentiation during development, tissue homeostasis and tumorigenesis<sup>31</sup>. EphA2 mediates cell positioning, cell morphology, polarity and motility<sup>32</sup>. As PKIs had no effect on HepG2 polarization (Supplementary Fig. 12), it is unlikely that changes in polarity explain their mode of action. Our results rather highlight a role of these RTKs in the formation of HCV entry factor complexes and membrane fusion. EGF accelerated HCV entry, suggesting that EGFR plays a key part in the HCV entry process, allowing HCV to efficiently enter its target cell. Applying FRET proximity analysis, we found that inhibition of EGFR or EphA2 activity reduced CD81-CLDN1 association. As EGFR activation has been reported to promote CLDN1 redistribution<sup>33,34</sup>, and we found that the level of CD81 or CLDN1 cell surface expression was not altered by EGFR silencing (Fig. 4a), we hypothesize that EGFR activation modulates intracellular or cell surface trafficking of CLDN1, CD81 or both, which is necessary to form viral envelope-CD81-CLDN1 co-receptor complexes<sup>19,23,24</sup>. The observations that erlotinib inhibits late steps in the kinetic infection assay and in the HCV cell fusion assay suggest a functional role for EGFR in pH-dependent fusion of viral and host cell membranes<sup>25,35</sup>.

Our functional experiments with specific ligands, antibodies and kinase inhibitors implicated both ligand-binding and kinase domains of EGFR in promoting HCV entry. EGFR ligands enhanced HCV infection, and an EGFR-specific antibody inhibited HCV infection. This antibody binds between ligand-binding domain III and the autoinhibition (tether) domain IV of the extracellular part of EGFR<sup>36</sup> and prevents EGF- and TGF- $\alpha$ -induced receptor dimerization<sup>37</sup>. Thus, it is likely that receptor dimerization and/or the domain targeted by the antibody are required for HCV entry. Taken together, these findings support a model in which EGFR-ligand binding activates the EGFR kinase function that is required for HCV entry.

We obtained similar results for EphA2, where antibodies specific for the extracellular domain of EphA2 inhibited HCV entry into PHHs and EphA2 surrogate ligands decreased viral entry. Because addition of surrogate ligands only reduced HCV entry to a small extent, it is





conceivable that the effect of EphA2 on HCV entry could be both ligand independent and ligand dependent. This is consistent with other well-characterized EphA2 functions such as cell invasion and migration<sup>38</sup>.

Given that our functional and mechanistic studies indicate that the expression and activity of EGFR and EphA2 seem to be involved in similar entry steps, it is likely that both RTKs are part of the same entry regulatory pathway. Because erlotinib and EGF modulated entry of HCVpp but showed minimal effects on the unrelated viruses studied (Supplementary Fig. 8), it is likely that the molecular mechanisms that we uncovered are most relevant for HCV entry.

Finally, our results have clinical implications for the prevention and treatment of HCV infection, as they show that licensed PKIs have antiviral activity *in vitro* and *in vivo* and identified a monoclonal RTK-specific antibody that inhibits viral entry. Thus, targeting RTKs as HCV entry factors using small molecules or antibodies may constitute a new approach to prevent and treat HCV infection and address antiviral resistance.

## METHODS

Methods and any associated references are available in the online version of the paper at <http://www.nature.com/naturemedicine/>.

Note: Supplementary information is available on the Nature Medicine website.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the European Research Council (ERC-2008-AdG-233130-HEPCENT), INTERREG-IV-Rhin Supérieur-FEDER-Hepato-Regio-Net 2009, Agence Nationale de la Recherche (ANR-05-CEXC-008), Agence Nationale de Recherche sur le Sida 2008/354, Région Alsace, Institut National du Cancer, the Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Strasbourg, the US National Institutes of Health (1K08DE020139-01A1), the UK Medical Research Council and the Wellcome Trust. We acknowledge A.-L. Morand, L. Froidevaux, A. Weiss, L. Poidevin, S. Durand and E. Soulier for excellent technical work. We thank R. Bartenschlager (University of Heidelberg) for providing Jc1 and Luc-Jc1 expression vectors, J. Ball (University of Nottingham) for UKN2A.2.4, UKN3A1.28 and UKN4.21.16 expression vectors, T. Wakita (National Institute of Infectious Diseases, Japan) for JFH1 constructs, C.M. Rice (The Rockefeller University) for Huh7.5 cells, F.V. Chisari (The Scripps Research Institute) for Huh7.5.1 cells, E. Harlow (Harvard University) for CDC2 expression plasmids and M. Tanaka (Hamamatsu University) for EphA2 expression plasmids.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

J.L., M.B.Z. and T.F.B. wrote the manuscript. J.L., M.B.Z., F.X., D.L., F.-L.C., J.A.M., and T.F.B. designed experiments and analyzed data. J.L., M.B.Z., F.X., C.T., I.F., L.Z., C.D., C.J.M., M.T., S.G., C.R., M.N.Z., D.L. and J.F. performed experiments. S.M.R., T.P., A.H.P., P.P. and M.D. contributed essential reagents. W.R. and O.P. performed bioinformatic analyses. J.L., B.F. and L.B. implemented and coordinated the siRNA screen. T.F.B. designed and supervised the project.

## COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors declare no competing financial interests.

Published online at <http://www.nature.com/naturemedicine/>.

Reprints and permissions information is available online at <http://www.nature.com/reprints/index.html>.

- Tai, A.W. & Chung, R.T. Treatment failure in hepatitis C: mechanisms of non-response. *J. Hepatol.* **50**, 412–420 (2009).
- Hézode, C. *et al.* Telaprevir and peginterferon with or without ribavirin for chronic HCV infection. *N. Engl. J. Med.* **360**, 1839–1850 (2009).
- Timpe, J.M. *et al.* Hepatitis C virus cell-cell transmission in hepatoma cells in the presence of neutralizing antibodies. *Hepatology* **47**, 17–24 (2008).
- Zeisel, M.B., Cosset, F.L. & Baumert, T.F. Host neutralizing responses and pathogenesis of hepatitis C virus infection. *Hepatology* **48**, 299–307 (2008).
- von Hahn, T. & Rice, C.M. Hepatitis C virus entry. *J. Biol. Chem.* **283**, 3689–3693 (2008).
- Barth, H. *et al.* Viral and cellular determinants of the hepatitis C virus envelope-heparan sulfate interaction. *J. Virol.* **80**, 10579–10590 (2006).
- Pileri, P. *et al.* Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* **282**, 938–941 (1998).
- Scarselli, E. *et al.* The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J.* **21**, 5017–5025 (2002).
- Evans, M.J. *et al.* Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* **446**, 801–805 (2007).
- Ploss, A. *et al.* Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature* **457**, 882–886 (2009).
- Hidalgo, M. & Bloedow, D. Pharmacokinetics and pharmacodynamics: maximizing the clinical potential of erlotinib (Tarceva). *Semin. Oncol.* **30**, 25–33 (2003).
- Shepherd, F.A. *et al.* Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* **353**, 123–132 (2005).
- Li, J. *et al.* A chemical and phosphoproteomic characterization of dasatinib action in lung cancer. *Nat. Chem. Biol.* **6**, 291–299 (2010).
- Fafi-Kremer, S. *et al.* Viral entry and escape from antibody-mediated neutralization influence hepatitis C virus reinfection in liver transplantation. *J. Exp. Med.* **207**, 2019–2031 (2010).
- Mee, C.J. *et al.* Polarization restricts hepatitis C virus entry into HepG2 hepatoma cells. *J. Virol.* **83**, 6211–6221 (2009).
- Schlessinger, J. Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. *Cell* **110**, 669–672 (2002).
- Thoresen, G.H. *et al.* Response to transforming growth factor  $\alpha$  (TGF $\alpha$ ) and epidermal growth factor (EGF) in hepatocytes: lower EGF receptor affinity of TGF $\alpha$  is associated with more sustained activation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase and greater efficacy in stimulation of DNA synthesis. *J. Cell. Physiol.* **175**, 10–18 (1998).
- Dreux, M. *et al.* Receptor complementation and mutagenesis reveal SR-BI as an essential HCV entry factor and functionally imply its intra- and extra-cellular domains. *PLoS Pathog.* **5**, e1000310 (2009).
- Krieger, S.E. *et al.* Inhibition of hepatitis C virus infection by anti-claudin-1 antibodies is mediated by neutralization of E2-CD81-claudin-1 associations. *Hepatology* **51**, 1144–1157 (2010).
- Koutsoudakis, G. *et al.* Characterization of the early steps of hepatitis C virus infection by using luciferase reporter viruses. *J. Virol.* **80**, 5308–5320 (2006).
- Zeisel, M.B. *et al.* Scavenger receptor class B type I is a key host factor for hepatitis C virus infection required for an entry step closely linked to CD81. *Hepatology* **46**, 1722–1731 (2007).
- Dreux, M. *et al.* High density lipoprotein inhibits hepatitis C virus-neutralizing antibodies by stimulating cell entry via activation of the scavenger receptor BI. *J. Biol. Chem.* **281**, 18285–18295 (2006).
- Harris, H.J. *et al.* Claudin association with CD81 defines hepatitis C virus entry. *J. Biol. Chem.* **285**, 21092–21102 (2010).
- Harris, H.J. *et al.* CD81 and claudin 1 coreceptor association: role in hepatitis C virus entry. *J. Virol.* **82**, 5007–5020 (2008).
- Lavillette, D. *et al.* Characterization of fusion determinants points to the involvement of three discrete regions of both E1 and E2 glycoproteins in the membrane fusion process of hepatitis C virus. *J. Virol.* **81**, 8752–8765 (2007).
- Witteveldt, J. *et al.* CD81 is dispensable for hepatitis C virus cell-to-cell transmission in hepatoma cells. *J. Gen. Virol.* **90**, 48–58 (2009).
- Hiraga, N. *et al.* Absence of viral interference and different susceptibility to interferon between hepatitis B virus and hepatitis C virus in human hepatocyte chimeric mice. *J. Hepatol.* **51**, 1046–1054 (2009).
- Kamiya, N. *et al.* Practical evaluation of a mouse with chimeric human liver model for hepatitis C virus infection using an NS3-4A protease inhibitor. *J. Gen. Virol.* **91**, 1668–1677 (2010).
- Meuleman, P. *et al.* Morphological and biochemical characterization of a human liver in a uPA-SCID mouse chimera. *Hepatology* **41**, 847–856 (2005).
- Higgins, B. *et al.* Antitumor activity of erlotinib (OSI-774, Tarceva) alone or in combination in human non-small cell lung cancer tumor xenograft models. *Anticancer Drugs* **15**, 503–512 (2004).
- Schneider, M.R. & Wolf, E. The epidermal growth factor receptor ligands at a glance. *J. Cell. Physiol.* **218**, 460–466 (2009).
- Lackmann, M. & Boyd, A.W. Eph, a protein family coming of age: more confusion, insight, or complexity? *Sci. Signal.* **1**, re2 (2008).
- Singh, A.B. & Harris, R.C. Epidermal growth factor receptor activation differentially regulates claudin expression and enhances transepithelial resistance in Madin-Darby canine kidney cells. *J. Biol. Chem.* **279**, 3543–3552 (2004).
- Flores-Benitez, D. *et al.* Control of tight junctional sealing: roles of epidermal growth factor and prostaglandin E2. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **297**, C611–C620 (2009).
- Blanchard, E. *et al.* Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J. Virol.* **80**, 6964–6972 (2006).
- Reiter, J.L. & Mailhe, N.J. A 1.8 kb alternative transcript from the human epidermal growth factor receptor gene encodes a truncated form of the receptor. *Nucleic Acids Res.* **24**, 4050–4056 (1996).
- McCole, D.F., Keely, S.J., Coffey, R.J. & Barrett, K.E. Transactivation of the epidermal growth factor receptor in colonic epithelial cells by carbachol requires extracellular release of transforming growth factor- $\alpha$ . *J. Biol. Chem.* **277**, 42603–42612 (2002).
- Miao, H. *et al.* EphA2 mediates ligand-dependent inhibition and ligand-independent promotion of cell migration and invasion via a reciprocal regulatory loop with Akt. *Cancer Cell* **16**, 9–20 (2009).
- Pestka, J.M. *et al.* Rapid induction of virus-neutralizing antibodies and viral clearance in a single-source outbreak of hepatitis C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 6025–6030 (2007).
- Rothenberg, S.M. *et al.* Modeling oncogene addiction using RNA interference. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 12480–12484 (2008).

**ONLINE METHODS**

**Infection of cell lines and primary human hepatocytes with HCVpp, HCVcc and serum-derived HCV.** Pseudotyped particles expressing envelope glycoproteins from various HCV strains (**Supplementary Methods**), vesicular stomatitis virus, murine leukemia virus, influenza, measles and endogenous feline leukemia virus (RD114) and HCVcc were generated as previously described<sup>14,41,42,44–46</sup>. Infection of Huh7, Huh7.5.1 cells and PHHs with HCVpp, HCVcc (half-maximal tissue culture infectious dose (TCID<sub>50</sub>)  $1 \times 10^3$ – $1 \times 10^4$  ml<sup>-1</sup> for Huh7.5.1 experiments, TCID<sub>50</sub>  $1 \times 10^5$ – $1 \times 10^6$  ml<sup>-1</sup> for PHH experiments) and serum-derived HCV (genotype 1b)<sup>47</sup> was performed as previously described<sup>14,19,21,48</sup>. Polarization of HepG2-CD81, determination of tight junction integrity and cell polarity index were performed, measured and calculated as previously described<sup>15</sup>. Gene silencing was performed 3 d before infection as described for the RNAi screen in the **Supplementary Methods**. Inhibitors, antibodies or ligands were added 1 h before HCVpp or HCVcc infection and during infection unless otherwise stated. Experiments with RTK ligands were conducted with serum-starved cells. Unless otherwise stated, HCV entry and infection was assessed by luciferase reporter gene expression.

**Analysis of HCV replication.** Electroporation of RNA derived from plasmid pSGR-JFH1 or replication-deficient mutant pSGR-JFH1/GND ( $\Delta$ )<sup>43</sup> was performed as previously described<sup>42</sup>. Twenty-four hours after electroporation, cells were incubated with inhibitors. Total RNA was isolated and HCV RNA was analyzed by northern blotting as previously described<sup>49</sup>.

**Rescue of gene silencing.** To assess whether silencing of endogenous RTKs could be rescued by expression of RNAi-resistant RTK expression,  $4 \times 10^6$  Huh7.5.1 cells were co-electroporated with 10  $\mu$ g siRNA targeting the 3' untranslated region of the endogenous cellular mRNA (siEGFR si3, siEphA2 si4, HS-CDC2\_14) and an RTK-encoding plasmid expressing siRNA-resistant mRNA containing a deletion of the 3' untranslated region (pEGFR, pEphA2, pCDC2)<sup>40,50,51</sup>. We seeded  $2.5 \times 10^4$  cells per cm<sup>2</sup> 72 h before infection with HCVcc (Luc-Jc1; genotype 2a/2a) or HCVpp (H77; genotype 1a). EGFR rescue in PHHs was performed by co-transduction with lentiviruses expressing shEGFR and/or EGFR<sup>40</sup> 72 h before infection with HCVpp (HCV-J; genotype 1b).

**Analysis of EGFR phosphorylation in PHHs and Huh7.5.1 cells.** EGFR phosphorylation was assessed in cell lysates with the Human Phospho-RTK Array Kit (R&D Systems), where RTKs are captured by antibodies spotted on a nitrocellulose membrane. Amounts of phospho-RTK were assessed with a horseradish peroxidase-conjugated pan-phospho-tyrosine-specific antibody followed by chemiluminescence detection as described by the manufacturer. Phospho-tyrosine (P-Tyr) and phosphorylation of the unrelated c-met proto-oncogene tyrosine kinase (MERTK) served as internal positive and negative controls. PHHs were incubated in EGF-free William's E medium (Sigma). Huh7.5.1 cells were serum-starved overnight before addition of ligands, inhibitors and antibodies.

**Analysis of HCV binding, postbinding and entry kinetics.** Analysis of HCV glycoprotein E2 binding to cells and HCV postbinding and entry kinetic assays were performed as previously described<sup>18,19,21</sup> with polyclonal SR-BI-specific<sup>21</sup> or monoclonal EGFR-specific antibodies (10–100  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>) (Millipore, Roche) or SR-BI<sup>21</sup> or EphA2-specific serum (produced as described in the **Supplementary Methods** and diluted 1 in 100) and corresponding controls<sup>21</sup> (R&D) (**Supplementary Methods** and **Supplementary Fig. 10**).

**Receptor association using fluorescence resonance energy transfer.** Homotypic and heterotypic interactions of CD81 and CLDN1 were analyzed as previously described<sup>15,23,24</sup>. The data from ten cells were normalized, and the localized expression was calculated.

**Membrane fusion.** HCV membrane fusion during viral entry was investigated with a cell-to-cell fusion assay as previously described<sup>25</sup>.

### Host cell kinases and HCV entry

**Cell-to-cell transmission of HCV.** Cell-to-cell transmission of HCV was assessed as previously described<sup>26</sup>. Briefly, producer Huh7.5.1 cells were electroporated with HCV Jc1 RNA and cultured with gene-silenced or naive target Huh7.5-GFP cells in the presence or absence of PKIs (10  $\mu$ M) (IC Laboratories). An HCV E2-neutralizing antibody<sup>26</sup> (25  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>) was added to block cell-free transmission<sup>26</sup>. After 24 h of coculture, cells were fixed with paraformaldehyde, stained with an NS5A-specific antibody (0.1  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>) (Virostat) and analyzed by flow cytometry<sup>26</sup>. Total and cell-to-cell transmission were defined as percentage HCV infection of Huh7.5-GFP<sup>+</sup> target cells (Ti) in the absence (total transmission) or presence (cell-to-cell transmission) of an HCV E2-specific antibody.

**HCV infection and treatment of chimeric uPA-SCID mice.** Chimeric mice repopulated with PHHs<sup>27,28</sup> were infected with serum-derived HCV (genotype 2a,  $1 \times 10^4$  HCV international units per mouse) via the orbital vein during isofluoran anesthetization (PhoenixBio, Japan). Erlotinib (Roche) administration and dosage (50 mg per kg body weight per day) were performed as previously described in xenograft tumor mouse models<sup>30</sup>. Four mice received 50 mg per kg body weight per day erlotinib and three mice received placebo from day -10 until day 20 of infection in two independent experiments (total 14 mice, two experiments of seven mice each). Serum HCV RNA, alanine transaminase, albumin and erlotinib were monitored as previously described<sup>28,52</sup>. All experimental procedures used to treat live mice in this study had been approved by the Animal Ethics Committee of PhoenixBio in accordance with Japanese legislation.

**Toxicity assays.** Cytotoxic effects on cells were assessed in triplicate by analyzing the ability to metabolize 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)<sup>53</sup>. Formazan crystals were solubilized 5 h after adding MTT (0.6 mg ml<sup>-1</sup>) (Sigma) as previously described<sup>53</sup>.

**Additional methods.** Detailed methodology is described in the **Supplementary Methods**.

41. Bartosch, B., Dubuisson, J. & Cosset, F.L. Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J. Exp. Med.* **197**, 633-642 (2003).
42. Pietschmann, T. *et al.* Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 7408-7413 (2006).
43. Kato, T. *et al.* Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. *Gastroenterology* **125**, 1808-1817 (2003).
44. Lavillette, D. *et al.* Characterization of host-range and cell entry properties of the major genotypes and subtypes of hepatitis C virus. *Hepatology* **41**, 265-274 (2005).
45. Frecha, C. *et al.* Efficient and stable transduction of resting B lymphocytes and primary chronic lymphocyte leukemia cells using measles virus GP displaying lentiviral vectors. *Blood* **114**, 3173-3180 (2009).
46. Sandrin, V. *et al.* Lentiviral vectors pseudotyped with a modified RD114 envelope glycoprotein show increased stability in sera and augmented transduction of primary lymphocytes and CD34<sup>+</sup> cells derived from human and nonhuman primates. *Blood* **100**, 823-832 (2002).
47. Fofana, I. *et al.* Monoclonal anti-claudin 1 antibodies prevent hepatitis C virus infection of primary human hepatocytes. *Gastroenterology* **139**, 953-964, 964.e1-e4 (2010).
48. Meunier, J.C. *et al.* Isolation and characterization of broadly neutralizing human monoclonal antibodies to the e1 glycoprotein of hepatitis C virus. *J. Virol.* **82**, 966-973 (2008).
49. Lohmann, V. *et al.* Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* **285**, 110-113 (1999).
50. van den Heuvel, S. & Harlow, E. Distinct roles for cyclin-dependent kinases in cell cycle control. *Science* **262**, 2050-2054 (1993).
51. Wang, Y. *et al.* Negative regulation of EphA2 receptor by Cbl. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **296**, 214-220 (2002).
52. Chahbouni, A., den Burger, J.C., Vos, R.M., Sinjewel, A. & Wilhelm, A.J. Simultaneous quantification of erlotinib, gefitinib and imatinib in human plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Ther. Drug Monit.* **31**, 683-687 (2009).
53. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55-63 (1983).

## EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy

Joachim Lupberger, Mirjam B. Zeisel, Fei Xiao, Christine Thumann, Isabel Fofana, Laetitia Zona, Christopher Davis, Christopher J. Mee, Marine Turek, Sebastian Gorke, Cathy Royer, Benoit Fischer, Muhammad N. Zahid, Dimitri Lavillette, Judith Fresquet, François–Loïc Cosset, S. Michael Rothenberg, Thomas Pietschmann, Arvind H. Patel, Patrick Pessaux, Michel Doffoël, Wolfgang Raffelsberger, Olivier Poch, Jane A. McKeating, Laurent Brino and Thomas F. Baumert

### SUPPLEMENTARY RESULTS

**RNAi screen identifies kinases with functional impact on HCV entry.** To identify host cell kinases involved in HCV entry, we performed a small interfering RNA (siRNA)–based screen silencing 691 human kinases and associated proteins in Huh7 hepatoma cells to comprehensively identify cellular kinases regulating HCV entry. Screening comprised three steps: a primary screen using HCV pseudoparticles (HCVpp) bearing HCV envelope glycoproteins and vesicular stomatitis virus pseudotyped particles (VSVpp) as an unrelated control virus. To validate the relevance of the identified kinases in the complete infectious viral life cycle, identified hits were confirmed in a secondary screen using cell–culture–derived HCV (HCVcc) (**Supplementary Fig. 1**). False positive results due to toxicity were excluded using MTT–based cell viability test (**Supplementary Table 2**). To exclude non–specific off–target effects by siRNA pools, hits were validated using four individual siRNAs in a third screen (**Supplementary Fig. 1**). 106 kinases were identified by the primary HCVpp screen (**Supplementary Table 1**) and, of these, 95 were confirmed by infection with HCVcc. 58 of the 95 kinases passing the secondary screen were validated in the third screen (**Supplementary Table 2**).

The genome–wide RNAi kinase screen identified 58 kinases with impact on HCV entry and initiation of HCV infection (**Supplementary Table 2**). These kinases constituted 11.2% of the human kinome<sup>1</sup>. This percentage is in a similar range as previously published RNAi screens targeting human immunodeficiency virus (HIV) (4.3% of human kinome)<sup>2</sup> and West Nile Virus (6.4% of human kinome)<sup>3</sup>. Using a genome–wide RNAi screen, Li and co–workers identified 407 host genes required for HCVcc (JFH1) infection<sup>4</sup>. Among these hits were 14 kinases (2.7% of the human kinome); four of these kinases (29%) were confirmed in our screen. These kinases were CHKA, RYK, PTK2B and PI4KA. Thus, our screen identified 54 novel cellular kinases as host factors for HCV entry, including EGFR, EphA2, and CDC2, which had not been identified previously<sup>4</sup>. The relatively small overlap of hits in the two HCV RNAi screens is not unusual and has been observed for other RNAi screens identifying host factors for HIV infection<sup>5</sup>. Reasons include the use of different siRNA libraries (Qiagen vs. Dharmacon) and screening formats (96 wells vs. 384 wells). Our screen was performed in a 96–well screening format with a particular focus on avoiding microplate edge effects, which increased the robustness and reproducibility (*Z*–value). This allowed us to use a more advanced statistical approach for threshold considerations with respect to significance analysis and false discovery rate considerations of each observed hit (see **Supplementary Methods**).



In contrast to the genome-wide screen which was limited to a detailed bioinformatic analysis of the identified hits<sup>4</sup>, our study for the first time provides a comprehensive functional analysis of kinases required predominantly for HCV entry by assessing the effect of gene silencing on HCVpp and VSVpp entry and HCVcc infection. Most importantly, we identified EGFR and EphA2 as novel co-factors for HCV entry, elucidated their functional relevance within the HCV entry process and identified them as targets for antiviral therapy.

**Bioinformatic analyses identify kinase networks involved in HCV entry.** For a classification of the known biological functions of the identified 58 kinases, we performed a bioinformatic analysis using the Ingenuity Pathways database<sup>3</sup>. This analysis revealed a high representation of genes involved in cell death (58.6%), amino acid metabolism, post-translational modification and small molecule biochemistry (51.7%), cancer (50.0%), cellular growth and proliferation (44.8%), and cell cycle as listed by percent frequency (**Supplementary Fig. 2a**). When classifying kinases with an impact on HCV but not VSV entry (**Supplementary Table 2**), amino acid metabolism, post-translational modification and small molecule biochemistry (19%), cell death (19%), cell morphology and development (15.5%), cellular function and maintenance (15.5%), cellular function and organization (13.8%), and cell signaling (12.1%), emerged among the top six categories as listed by percent frequency (**Supplementary Fig. 2b**).

Next, the identified hits were analyzed for known and predicted protein interactions using the STRING database<sup>6</sup>. STRING represents a meta-database mapping of all known protein-protein interactions onto a common set of genomes and proteins<sup>6</sup>. Analysis of the 58 kinases identified in the RNAi screen revealed kinase networks regulating cell morphology including cell polarity, tight junction (TJ) permeability, and cell adhesion, as well as networks of kinases involved in the cell cycle (**Supplementary Fig. 2c**). Key interactions were confirmed using the IntAct database<sup>7</sup>. However, STRING analysis resulted in the most detailed network, which is due to the fact that STRING contains the largest collection of data sets for protein-protein interactions. Furthermore, STRING provides detailed and integral quality-scores which are of great importance in keeping the rate of false positives as low as possible<sup>6</sup>. To further confirm the validity of the identified network, we randomly selected 1000 groups of 58 kinases (from a collective of 691 kinases and associated molecules) and compared the connectivity of these random collections to our identified network presented in **Supplementary Fig. 2**. The subsequent comparison revealed that none of the randomly chosen sets of 58 kinases shows a single instance ( $P < 0.001$ ) of our identified network or anything similar (matching at least 20% of the network in **Supplementary Fig. 2c**). Taken together, these results demonstrate that the network depicted in

**Supplementary Fig. 2c** is the result of extensive and reproducible bioinformatic analyses and highly distinct from a random product.

Five kinases are targets of clinically licensed protein kinase inhibitors (PKIs). These include ephrin receptor A2 EphA2 (*Dasatinib*), epidermal growth factor receptor EGFR (*Erlotinib*), cell division cycle 2 kinase CDC2 (*Flavopiridol*), cyclin-dependent kinase 4 CDK4 (*Flavopiridol*) and cyclin-dependent kinase 8 CDK8 (*Flavopiridol*) (**Supplementary Fig. 2c**). Silencing by kinase-specific siRNAs reduced HCVpp entry by 4.39 fold for EGFR, 3.05 fold for EphA2, 14.96 fold for CDC2, 9.76 fold for CDK4 and 6.36 fold for CDK8 (**Supplementary Table 2**).

**Cell cycle control and HCV entry.** STRING analysis pointed to a network that included 12 kinases involved in cell cycle regulation (**Supplementary Fig. 2c** and **Supplementary Table 2**), including CDC2, CDK4, CDK8, cholin kinase alpha (CHKA), cholin kinase beta (CHKB), cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (CDKN1B), CDC28 protein kinase regulatory subunit 1B (CKS1B), ataxia telangiectasia mutated protein (ATM), polo-like kinase 1 (PLK1), polo-like kinase 3 (PLK3), aurora kinase B (AURKB), inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer kinase B in B-cells (IKBKB). Although we cannot exclude the possibility that these molecules were identified because of intrinsic properties of the cell division-dependent hepatoma model system, several observations support a specific role of cyclin-dependent kinases (CDKs) for HCV entry: first, silencing of kinases potently inhibited HCVpp entry and HCV infection (**Supplementary Table 2** and **Supplementary Fig. 3a–d**). Second, after gene silencing (apart from experiments with CHKA and IKBKB), no cytotoxicity was observed as measured by the cellular metabolite MTT (**Supplementary Table 2**). This suggests that the silencing of kinases was not due to non-specific toxic effects. Third, silencing/rescue experiments further confirmed a functional role for CDC2 in HCV entry (**Supplementary Fig. 3e**). Fourth, *Flavopiridol* — a well-characterized inhibitor of CDKs — markedly inhibited HCVpp entry in the absence of any detectable cytotoxic effects in PHH (**Supplementary Fig. 3f**). These data suggest that the effect of CDKs is not related to either the model target cell line or the pseudoparticle entry assay, and is relevant to HCV entry. It is well known that CDKs play an important role in the life cycle of HIV and herpes viruses. These include regulation of HIV transcription by CDK9<sup>8</sup> and the activation by Kaposi sarcoma-associated herpes virus of CDK4 and CDK6 that regulate microfilament organization and cell morphology<sup>9</sup>. Thus, it is conceivable that similar mechanisms apply for HCV entry.

**Kinases involved in integrin signaling and HCV entry.** Furthermore, the screen identified kinases involved in cell adhesion and integrin signaling: focal adhesion kinase (PTK2), focal adhesion kinase 2 (PTK2B), and integrin-linked kinase (ILK), all of these kinases regulate cell adhesion and cell-matrix interaction<sup>10,11</sup> (**Supplementary Table 2**). It has been shown that CD81 — a key HCV entry factor — and other tetraspanins are associated with adhesion receptors of the integrin family and regulate integrin-dependent cell migration<sup>12</sup>. It is thus conceivable that

functional integrin signaling might be a prerequisite for HCV entry factor trafficking and localization on the cell surface — and therefore for HCV entry. In this context a number of tetraspanins, including CD81, are associated with type II phosphatidylinositol 4-kinase and it is suggested that this may facilitate the assembly of signaling complexes by tethering these enzymes to integrin heterodimers<sup>12</sup>. It is of interest to note that silencing of phosphatidylinositol 4-kinase type 2 alpha (PI4KII) impaired HCV entry and infection (**Supplementary Table 1**). Moreover, it is known that integrin signaling plays a pivotal role in the entry of other viruses such as adenovirus, hantavirus and herpesviruses (for review see<sup>13</sup>): HCV may therefore have another integrin-dependent entry mechanism.

**EGFR and EphA2 do not mediate HCV entry by modulation of cell polarity.** EphA2 and EGFR are involved in regulation of cell polarity<sup>14-17</sup> and polarization has been shown to restrict HCV entry<sup>18,19</sup>. Since blocking kinase function inhibited HCV entry, we investigated whether PKI treatment modulated HepG2 polarization. *Dasatinib* reduced HepG2 polarization and *Erlotinib* had no effect (**Supplementary Fig. 12a**). TJ integrity was not affected (**Supplementary Fig. 12b**). These data indicate that the marked inhibition of HCV entry cannot be explained by a PKI-induced decrease in polarization.

**Modulation of HCV entry by EphA2-specific ligands and antibodies.** Since EphA2 is constitutively active and its degradation is modulated by membrane-bound ligands during cell-cell contact<sup>20-22</sup>, the investigation of ligand-induced activation of EphA2 in cell culture models is technically more complex. To address this question, we used soluble model ligands ephrin-A1 and -A3 which have been reported to mimic some but not all mechanisms of cell-cell contact<sup>21</sup>. Ephrin-A1 and -A3 have been shown to induce the degradation of cell surface EphA2<sup>20,21</sup>. The addition of ephrin-A1 or -A3 but not of control ligand resulted in a small but highly reproducible and significant ( $P < 0.0005$ ) decrease of HCV entry that was dependent on target cell density (**Supplementary Fig. 9a**). To further address the role of EphA2 ligand binding domain for HCV entry, we produced polyclonal antibodies to the EphA2 extracellular loop by genetic immunization. The polyclonal antibodies specifically bound to the native EphA2 extracellular domain as demonstrated by the specific binding of the antibodies to non-permeabilized BOSC and CHO cells transfected to express human EphA2 (**Supplementary Fig. 9b** and data not shown) and the HCV permissive hepatoma cell line Huh7.5.1 (**Supplementary Fig. 9c**). Pre-incubation of PHH with antibodies to EphA2 significantly ( $P < 0.005$ ) inhibited HCV entry, suggesting that engagement of the EphA2 extracellular domain contributes to its effect on HCV entry (**Supplementary Fig. 9d**).

**Clinical approved PKIs inhibit entry of highly diverse HCV escape variants.** *Erlotinib* and *Dasatinib* inhibited HCV infection at dose ranges ( $IC_{50}$  0.45–0.53  $\mu$ M) similar to mean plasma concentrations of patients during cancer treatment (*Dasatinib*  $\sim$ 0.2  $\mu$ M; *Erlotinib*  $\sim$ 4  $\mu$ M)<sup>23-25</sup>. Furthermore, *Flavopiridol* inhibited HCV entry ( $IC_{50}$  0.005  $\mu$ M) in concentrations well below

clinical use in cancer treatment ( $\sim 2 \mu\text{M}^{26}$ ) (**Supplementary Fig. 3f**). Therefore, we further assessed the potential of PKIs as antivirals by investigating their impact on infection of 14 HCV strains isolated from 6 patients undergoing liver transplantation<sup>27</sup>. These variants re-infecting the liver graft (“escape variants”) were characterized by high infectivity and marked resistance to autologous host neutralizing responses<sup>27</sup>. Pre-incubation of cells with approved kinase inhibitors markedly and significantly ( $P < 0.0005$ ) inhibited entry of HCV escape variants in PHH and Huh7.5.1 cells without decreasing cell viability (**Supplementary Fig. 6**, data not shown). In contrast, pre-incubation of cells with *Blebbistatin*, an unrelated small molecule inhibitor did not decrease entry of HCV isolates (**Supplementary Fig. 6**). These data demonstrate that *Erlotinib*, *Dasatinib* and *Flavopiridol* inhibit entry of highly infectious HCV escape variants, which are resistant to autologous neutralizing antibodies.

**Clinical implications of identified RTKs for HCV pathogenesis and treatment.** *In vivo*, expression of EphA2 and EGFR has been shown to be elevated in HCV-induced hepatocellular carcinoma (HCC)<sup>28,29</sup>. However, a detailed analysis of EGFR and EphA2 expression in the hepatocytes of HCV-infected patients *in vivo* is not yet available. TGF- $\alpha$  expression is elevated in the liver of HCC or chronically HCV infected patients<sup>30</sup>. In *in vitro* model systems, EGFR expression is increased in HCV infected cells<sup>31</sup>. Furthermore, HCV non-structural protein NS5A has been reported to alter EGFR trafficking<sup>32</sup> and HCV NS3/4A protease activates EGFR-induced signal transduction<sup>33</sup>. HCV core protein has been reported to enhance expression of TGF- $\alpha$  – an EGFR ligand<sup>34</sup>. Finally, HCV NS4B has been shown to enhance EphA2 expression<sup>35</sup>. Taken together, these findings suggest that HCV may not only use RTKs as co-factors for HCV entry but at the same time modulates their expression and function. Further studies are underway to investigate the relevance of virus-induced regulation of EGFR expression and signaling for HCV entry and pathogenesis of HCV infection (e.g. the presence of virus-induced positive feedback loops).

Furthermore, our results have important clinical implications for the prevention and treatment of HCV infection. PKIs and antibodies to RTKs are well established and approved drugs for cancer treatment and have a well characterized and manageable safety profile in humans<sup>36,37</sup>. Similar to standard of care or direct acting antivirals (DAAs) in development, the clinical use of these inhibitors is limited by adverse effects. Next generation EGFR kinase inhibitors with improved safety profiles<sup>38</sup> may address this limitation and thus are interesting antiviral candidates in the future. Although the antiviral potency of PKIs appears to be lower than DAAs targeting viral protein processing and replication, PKIs and monoclonal antibodies to RTKs are very attractive and clinically relevant antiviral compounds since they target complementary host factors required for viral infection. Indeed, there is increasing evidence that targeting essential host factors will increase the genetic barrier for viral resistance<sup>39-41</sup> and that ultimately a combination of complementary antivirals will be required to prevent antiviral resistance<sup>41</sup>. This concept is further supported by our results demonstrating that PKIs efficiently inhibit entry of escape viruses that are resistant to patients’ immune responses (**Supplementary**

**Fig. 6).** Thus, the development of PKIs specifically targeting the proviral function of RTKs and the combination of PKIs with DAAs or standard of care may further increase their antiviral activity in eradicating HCV. Finally, a case report describing HCV clearance during *Erlotinib* treatment of a patient with metastatic hepatocellular carcinoma and chronic HCV infection provides further clinical evidence for an antiviral effect of PKIs *in vivo*<sup>42</sup>.

## SUPPLEMENTARY METHODS

**Genome-wide RNAi kinase HCV entry screen.** Screening was performed at the High Throughput Screening platform of the Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC) in Illkirch, France. The library used for this screen was the Human Kinase siRNA Set Version 2.0 (pool of four siRNAs) and individual siRNAs were obtained from Qiagen. A functional HCV entry siRNA screen targeting 691 cellular kinases and associated proteins was established as outlined (**Supplementary Fig. 1**). For each target 3.5 pmol siRNA was reverse transfected in 5,000 Huh7 cells  $0.3 \text{ cm}^{-2}$  using INTERFERin reagent (Polyplus). The effect of gene silencing on viral entry was investigated three days after siRNA transfection using HCVpp (H77; genotype 1a)<sup>27,43</sup> harboring a luciferase reporter gene. Impact on VSVpp entry was analyzed side-by-side. Virus entry was assessed two days after infection by measuring reporter gene luciferase activity in cell lysates using the Bright Glo Luciferase assay system (Promega) and a Mithras LB 940 luminometer (Berthold Technologies). Hits were validated independently using four different single siRNAs silencing the same target mRNA. Validation using HCVcc strain Luc-Jc1<sup>44</sup> ( $\text{TCID}_{50} 10^3 \text{ mL}^{-1}$ – $10^4 \text{ mL}^{-1}$ ) was performed in Huh7.5.1 cells using the same protocol as described above. All siRNA screens were performed in 96-well cell culture microplates. Luciferase results were normalized by protein content of the lysates using DC Protein Assay (Bio-Rad). To minimize non-specific effects due to evaporation, outside wells were not used for the screens but were filled with phosphate buffered saline (PBS). Non-specific effects of gene silencing due to changes in cell proliferation were normalized by measuring the protein content of the individual well. The quality of the established high-throughput screens, the individual plate designs as well as the amount of replicates were assessed in pilot experiments by calculating the Z-factor<sup>45</sup>. The HCVpp screens ( $Z=0.37$ ) were performed in duplicates with 60 of 96 central plate positions used for the screen. The HCVcc validation screens ( $Z=0.47$ ) were performed in triplicates with 32 of 96 central plate positions used for the screen. As an internal quality control of gene silencing and HCVpp and HCVcc infection, positive and negative control siRNAs (targeting CD81 and GFP, respectively) were transfected side-by-side on each plate. Cytotoxic effects on cells were assessed in triplicates by analyzing the ability to metabolize 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) as described (**Methods**).

**Statistical analysis: hit selection.** The impact of gene silencing was defined by an increase or decrease of HCVpp entry expressed as the ratio of entry compared to the experimental mean value of entry into control transfected cells (siRNA targeting GFP). The local false discovery rates (fdr) for all comparisons for each gene were determined using the library “fdrtool”<sup>46</sup>. Resulting fdr-value were examined for their distribution in order to define meaningful cut-offs (data not shown). Finally, for HCVpp a threshold of  $\text{fdr} < 0.001$  (corresponding to a maximum p-value of  $1.04 \times 10^{-4}$ ), for HCVcc a threshold of  $\text{fdr} < 0.05$  (corresponding to a maximum p-value of  $2.05 \times 10^{-2}$ ) and for VSVpp a threshold of  $\text{fdr} < 0.08$  (corresponding to a maximum p-value of  $8.03 \times 10^{-2}$ ) were chosen as stringent parameters based on the underlying frequency distributions

(data not shown). All candidates chosen for further validation are highlighted in **Supplementary Table 1**. To address potential off-target effects by pooled siRNAs, candidate genes were validated if HCV entry was reduced  $\geq 50\%$  compared to control transfected cells by at least two individual siRNAs (**Supplementary Table 2**).

**Gene ontology and gene annotation.** Gene ontology terms and gene associations were obtained from Human Kinase siRNA Set Version 2.0 validated by Ingenuity Pathways database (Mountainview, CA, USA). Biological function analysis of the identified kinases was performed using Ingenuity Pathways database<sup>3</sup>. Biological function terms were accepted if they were significantly enriched with a p-value  $< 10^{-5}$  as calculated by Ingenuity Pathways database. Additionally, the identified hits were analyzed for known and predicted protein interactions using STRING meta-database that maps all interaction evidence onto a common set of genomes and proteins<sup>6</sup>. The interactions addressed include direct (physical) and indirect (functional) associations derived from numerous sources, including experimental repositories, computational prediction methods and public text collections<sup>6</sup>.

**HCV strains for production of HCVpp and HCVcc.** HCVpp from strains H77, HCV-J, JFH1, J6, UKN2A.2.4, UKN3A1.28, UKN4.21.16, P01VL, P02VH, P02VI, P02VJ, P03VC, P04VC, P04VD, P04VE, P05VD, P05VE, P05VF, P06VG, P06VH, P06VI<sup>27,43,47</sup> and HCVcc<sup>44,48</sup> (strains JFH1, Jc1, Luc-Jc1) were produced as described.

**siRNAs and expression plasmids used for rescue experiments and functional studies.** siEGFR si3 (Hs-EGFR\_6, 5'-CAUCCAAUUUAUCAAGGAATT-3') and si4 (Hs-EGFR\_12, 5'-GGAACUGGAUUAUCUGAAATT-3'), siEphA2 si4 (Hs-EPHA2\_8, 5'-GGACAGACAU AUAGGAUAUTT-3'), siCDC2 (Hs-CDC2\_14, 5'-GGUUAUAUCUCAUCUUUGATT-3') were obtained from Qiagen. siCTRL, siCD81, siSR-BI have been described<sup>48</sup>. Lentiviral expression plasmids pLKO-shEGFR<sup>49</sup>, pWPI-EGFRWT<sup>49</sup>, pEGFR-L858R<sup>50</sup>, and expression plasmid pEphA2-WT<sup>51</sup> and pCDC2-WT (Addgene plasmid 1886)<sup>52</sup> have been described.

**Protein kinase inhibitors, ligands and antibodies.** Erlotinib, Gefitinib, Lapatinib and Dasatinib were obtained from IC Laboratories, Flavopiridol and Concanamycin A from Sigma, BILN-2061 from Boehringer Ingelheim and IFN- $\alpha$ -2a from Roche. All other small molecules and DMSO (used at a final concentration 0.7% for incubation of PKIs and control experiments) were obtained from Merck. Recombinant EGF and TGF- $\alpha$  were obtained from Sigma and soluble tagged ephrin ligands and tag controls from R&D. Production and purification of soluble His-tagged HCV E2 glycoprotein has been described<sup>53</sup>. Antibodies to EGFR (528), CD81 (5A6), EphA2 (C-20), and occludin (H-279) were obtained from Santa Cruz; antibody to E2 (AP33) from Genentech, antibody to EGFR (LA-1) from Millipore; antibody to NS5A from Virostat; antibody to CD81 (JS81) from BD; antibody to CLDN1 (1C5-D9) from Abnova; antibody to occludin (OC-3F10) from Zymed; antibody to actin (EP1123Y) from Abcam; antibody to CDC2 from Cell Signaling; antibody to His<sub>6</sub> from Qiagen, PE-conjugated antibody to mouse and Cy3-



conjugated antibody to mouse from Jackson ImmunoResearch, alkaline-phosphatase (AP)-labeled secondary antibodies from GE Healthcare. Polyclonal antibody to human EphA2 was raised by genetic immunization of Wistar rats by an expression vector containing the full-length human EphA2 cDNA as described previously for CLDN1-specific antibodies<sup>54</sup>. Polyclonal SR-BI-specific antibodies used for E2binding and postbinding experiments has been described<sup>48,55</sup>.

**Cell lines and primary hepatocytes.** The sources and culture conditions for BOSC, CHO, 293T, Huh7, Huh7.5, Huh7.5.1 and HepG2-CD81 cells have been described<sup>19,43,56,57</sup>. Primary human hepatocytes (PHH) were isolated and cultured as described<sup>54</sup>. The mouse hepatoma cell line AML12 (#CRL-2254) was obtained from ATCC. The AML12 4R cell line was created by lentiviral gene transfer using lentiviruses transducing individual human CD81, SR-BI, CLDN1 and OCLN genes and subsequent selection of transduced cells with blasticidin and G418 as described previously<sup>58</sup>. The AML12 4R-hEGFR+ cell line was created by lentiviral gene transfer using vector pEGFR-L858R transducing active human EGFR<sup>50</sup>.

**HCV infection of primary hepatocytes.** One day following PHH isolation and plating, PHH were washed with PBS and pre-incubated in the presence or absence of EGF, TGF- $\alpha$ , PKIs, EGFR-specific antibody or EphA2-specific serum for 1 h at 37 °C in William's E medium. Then, HIV-based HCVpp (J6)<sup>54</sup>, HCVcc (J6-JFH1; Jc1, genotype 2a/2a, TCID<sub>50</sub>: 10<sup>5</sup> mL<sup>-1</sup>–10<sup>6</sup> mL<sup>-1</sup>)<sup>59</sup> or serum-derived HCV (HCV-positive infectious serum, genotype 1b described in ref.<sup>40</sup>) were added for 4 h at 37 °C. Following infection, fresh medium was added. HCVpp entry was assessed by measurement of luciferase activity 72 h postinfection as described<sup>27,54</sup>. HCVcc and infection with serum-derived HCV were assessed by HCV-specific qRT-PCR of purified intracellular HCV RNA as described<sup>40</sup>.

**Analyses of mRNA and protein expression.** Cellular mRNA was extracted using RNeasy extraction kit (Qiagen) and quantified by qRT-PCR using Fastlane Cell Sybr Green kit (Qiagen)<sup>48</sup>. Western blots of cell lysates using protein-specific antibodies was performed following GE Healthcare protocols using Hybond-P membranes and visualized using ECF substrate and Typhoon Trio high performance fluorescence scanner (GE Healthcare). Immunostaining of HCV-infected cells was performed as described<sup>60</sup>. Kinase expression in liver was further confirmed by GeneAtlas database (BioGPS, Novartis Research Foundation, <http://biogps.gnf.org>) and is indicated (**Supplementary Table 2**).

**Analysis of IC<sub>50</sub> for PKIs and EGFR-specific antibody.** IC<sub>50</sub> was derived by logistic regression<sup>61</sup> using OriginPro (OriginLabs). IC<sub>50</sub> values are expressed as median of three independent experiments  $\pm$  standard error of the median.

**Analysis of HCV postbinding steps and entry kinetics.** HCV postbinding steps and entry kinetics were investigated as described<sup>48,54</sup>. Briefly, HCVcc (Luc-Jc1; genotype 2a/2a) binding to

Huh7.5.1 cells or HCVpp (P01VL, genotype 1b) binding to PHH was performed for 1 h at 4 °C in the presence or absence of heparin (250 µg mL<sup>-1</sup>), control or anti-CD81 (5 and 10 µg mL<sup>-1</sup>) and anti-EGFR IgG (10 and 50 µg mL<sup>-1</sup>), anti-SR-BI or control serum (1:50), DMSO (0.7%) or PKIs (10 µM), Concanamycin A (ConA, 25 nM), before cells were washed and incubated with the indicated compounds for 4 h at 37 °C. HCVcc infection and HCVpp entry were assessed by luciferase reporter gene assay and expressed relative to control infections without addition of inhibitors as described<sup>48,54,62,63</sup>. For the study of HCV entry kinetics, compounds were added every 20 min for up to 120 min after viral binding. To assess the effect of EGF on HCVcc entry kinetics, serum-starved Huh7.5.1 cells were pre-incubated in serum-free medium in the presence or absence of EGF (1 µg mL<sup>-1</sup>) prior to HCVcc binding and entry in the presence or absence of EGF (1 µg mL<sup>-1</sup>). Complete medium supplemented with EGF (1 µg mL<sup>-1</sup>) was added after the 4 h incubation period at 37 °C for 48 h.

### SUPPLEMENTARY REFERENCES

1. Manning, G., Whyte, D.B., Martinez, R., Hunter, T. & Sudarsanam, S. The protein kinase complement of the human genome. *Science* **298**, 1912-1934 (2002).
2. Brass, A.L., *et al.* Identification of host proteins required for HIV infection through a functional genomic screen. *Science* **319**, 921-926 (2008).
3. Krishnan, M.N., *et al.* RNA interference screen for human genes associated with West Nile virus infection. *Nature* **455**, 242-245 (2008).
4. Li, Q., *et al.* A genome-wide genetic screen for host factors required for hepatitis C virus propagation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 16410-16415 (2009).
5. Kok, K.H., Lei, T. & Jin, D.Y. siRNA and shRNA screens advance key understanding of host factors required for HIV-1 replication. *Retrovirology* **6**, 78 (2009).
6. Jensen, L.J., *et al.* STRING 8--a global view on proteins and their functional interactions in 630 organisms. *Nucleic Acids Res.* **37**, D412-416 (2009).
7. Aranda, B., *et al.* The IntAct molecular interaction database in 2010. *Nucleic. Acids Res.* **38**, D525-531 (2010).
8. Zhou, M., *et al.* Bromodomain protein Brd4 regulates human immunodeficiency virus transcription through phosphorylation of CDK9 at threonine 29. *J. Virol.* **83**, 1036-1044 (2009).
9. Cuomo, M.E., *et al.* Regulation of microfilament organization by Kaposi sarcoma-associated herpes virus-cyclin.CDK6 phosphorylation of caldesmon. *J. Biol. Chem.* **280**, 35844-35858 (2005).
10. De Nichilo, M.O., Katz, B.Z., O'Connell, B. & Yamada, K.M. De novo expression of pp125FAK in human macrophages regulates CSK distribution and MAP kinase activation but does not affect focal contact structure. *J. Cell. Physiol.* **178**, 164-172 (1999).
11. Harburger, D.S. & Calderwood, D.A. Integrin signalling at a glance. *J. Cell. Sci.* **122**, 159-163 (2009).
12. Berditchevski, F. Complexes of tetraspanins with integrins: more than meets the eye. *J. Cell. Sci.* **114**, 4143-4151 (2001).
13. Stewart, P.L. & Nemerow, G.R. Cell integrins: commonly used receptors for diverse viral pathogens. *Trends Microbiol.* **15**, 500-507 (2007).

14. Basuroy, S., Seth, A., Elias, B., Naren, A.P. & Rao, R. MAPK interacts with occludin and mediates EGF-induced prevention of tight junction disruption by hydrogen peroxide. *Biochem. J.* **393**, 69-77 (2006).
15. Lackmann, M. & Boyd, A.W. Eph, a protein family coming of age: more confusion, insight, or complexity? *Sci. Signal.* **1**, re2 (2008).
16. Singh, A.B. & Harris, R.C. Epidermal growth factor receptor activation differentially regulates claudin expression and enhances transepithelial resistance in Madin-Darby canine kidney cells. *J. Biol. Chem.* **279**, 3543-3552 (2004).
17. Tanaka, M., Kamata, R. & Sakai, R. EphA2 phosphorylates the cytoplasmic tail of Claudin-4 and mediates paracellular permeability. *J. Biol. Chem.* **280**, 42375-42382 (2005).
18. Mee, C.J., *et al.* Effect of cell polarization on hepatitis C virus entry. *J. Virol.* **82**, 461-470 (2008).
19. Mee, C.J., *et al.* Polarization restricts hepatitis C virus entry into HepG2 hepatoma cells. *J. Virol.* **83**, 6211-6221 (2009).
20. Binns, K.L., Taylor, P.P., Sicheri, F., Pawson, T. & Holland, S.J. Phosphorylation of tyrosine residues in the kinase domain and juxtamembrane region regulates the biological and catalytic activities of Eph receptors. *Mol. Cell Biol.* **20**, 4791-4805 (2000).
21. Walker-Daniels, J., Riese, D.J., 2nd & Kinch, M.S. c-Cbl-dependent EphA2 protein degradation is induced by ligand binding. *Mol. Cancer Res.* **1**, 79-87 (2002).
22. Himanen, J.P., *et al.* Architecture of Eph receptor clusters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 10860-10865 (2010).
23. Christopher, L.J., *et al.* Metabolism and disposition of dasatinib after oral administration to humans. *Drug Metab. Dispos.* **36**, 1357-1364 (2008).
24. Frohna, P., *et al.* Evaluation of the absolute oral bioavailability and bioequivalence of erlotinib, an inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, in a randomized, crossover study in healthy subjects. *J. Clin. Pharmacol.* **46**, 282-290 (2006).
25. Prados, M.D., *et al.* Phase 1 study of erlotinib HCl alone and combined with temozolomide in patients with stable or recurrent malignant glioma. *Neuro. Oncol.* **8**, 67-78 (2006).

26. Byrd, J.C., *et al.* Flavopiridol administered using a pharmacologically derived schedule is associated with marked clinical efficacy in refractory, genetically high-risk chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **109**, 399-404 (2007).
27. Fafi-Kremer, S., *et al.* Viral entry and escape from antibody-mediated neutralization influence hepatitis C virus reinfection in liver transplantation. *J. Exp. Med.* **207**, 2019-2031 (2010).
28. Yang, P., *et al.* Overexpression of EphA2, MMP-9, and MVD-CD34 in hepatocellular carcinoma: Implications for tumor progression and prognosis. *Hepatol. Res.* **39**, 1169-1177 (2009).
29. Buckley, A.F., Burgart, L.J., Sahai, V. & Kakar, S. Epidermal growth factor receptor expression and gene copy number in conventional hepatocellular carcinoma. *Am. J. Clin. Pathol.* **129**, 245-251 (2008).
30. Chung, Y.H., *et al.* Expression of transforming growth factor-alpha mRNA in livers of patients with chronic viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Cancer* **89**, 977-982 (2000).
31. Duong, F.H., Christen, V., Lin, S. & Heim, M.H. Hepatitis C virus-induced up-regulation of protein phosphatase 2A inhibits histone modification and DNA damage repair. *Hepatology* **51**, 741-751 (2010).
32. Mankouri, J., Griffin, S. & Harris, M. The hepatitis C virus non-structural protein NS5A alters the trafficking profile of the epidermal growth factor receptor. *Traffic* **9**, 1497-1509 (2008).
33. Brenndorfer, E.D., *et al.* Nonstructural 3/4A protease of hepatitis C virus activates epithelial growth factor-induced signal transduction by cleavage of the T-cell protein tyrosine phosphatase. *Hepatology* **49**, 1810-1820 (2009).
34. Sato, Y., *et al.* Hepatitis C virus core protein promotes proliferation of human hepatoma cells through enhancement of transforming growth factor alpha expression via activation of nuclear factor-kappaB. *Gut* **55**, 1801-1808 (2006).
35. Zheng, Y., *et al.* Gene expression profiles of HeLa Cells impacted by hepatitis C virus non-structural protein NS4B. *J. Biochem. Mol. Biol.* **38**, 151-160 (2005).
36. Shepherd, F.A., *et al.* Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* **353**, 123-132 (2005).

37. Wong, S.F. Dasatinib dosing strategies in Philadelphia chromosome-positive leukemia. *J. Oncol. Pharm. Pract.* **15**, 17-27 (2009).
38. Pao, W. & Chmielecki, J. Rational, biologically based treatment of EGFR-mutant non-small-cell lung cancer. *Nat. Rev. Cancer* **10**, 760-774 (2010).
39. Lanford, R.E., *et al.* Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science* **327**, 198-201 (2010).
40. Fofana, I., *et al.* Monoclonal anti-claudin 1 antibodies prevent hepatitis C virus infection of primary human hepatocytes. *Gastroenterology* **139**, 953-964, 964 e951-954 (2010).
41. Georgel, P., *et al.* Virus-host interactions in hepatitis C virus infection: implications for molecular pathogenesis and antiviral strategies. *Trends Mol. Med.* **16**, 277-286 (2010).
42. Bardou-Jacquet, E., Lorho, R. & Guyader, D. Kinase inhibitors in the treatment of chronic hepatitis C virus. *Gut*, in press (2010).
43. Bartosch, B., Dubuisson, J. & Cosset, F.L. Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J. Exp. Med.* **197**, 633-642 (2003).
44. Pietschmann, T., *et al.* Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 7408-7413 (2006).
45. Zhang, J.H., Chung, T.D. & Oldenburg, K.R. A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J. Biomol. Screen.* **4**, 67-73 (1999).
46. Strimmer, K. fdrtool: a versatile R package for estimating local and tail area-based false discovery rates. *Bioinformatics* **24**, 1461-1462 (2008).
47. Lavillette, D., *et al.* Characterization of host-range and cell entry properties of the major genotypes and subtypes of hepatitis C virus. *Hepatology* **41**, 265-274 (2005).
48. Zeisel, M.B., *et al.* Scavenger receptor class B type I is a key host factor for hepatitis C virus infection required for an entry step closely linked to CD81. *Hepatology* **46**, 1722-1731 (2007).
49. Rothenberg, S.M., *et al.* Modeling oncogene addiction using RNA interference. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 12480-12484 (2008).

50. Li, J., *et al.* A chemical and phosphoproteomic characterization of dasatinib action in lung cancer. *Nat. Chem. Biol.* **6**, 291-299 (2010).
51. Wang, Y., *et al.* Negative regulation of EphA2 receptor by Cbl. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **296**, 214-220 (2002).
52. van den Heuvel, S. & Harlow, E. Distinct roles for cyclin-dependent kinases in cell cycle control. *Science* **262**, 2050-2054 (1993).
53. Dreux, M., *et al.* Receptor complementation and mutagenesis reveal SR-BI as an essential HCV entry factor and functionally imply its intra- and extra-cellular domains. *PLoS Pathog.* **5**, e1000310 (2009).
54. Krieger, S.E., *et al.* Inhibition of hepatitis C virus infection by anti-claudin-1 antibodies is mediated by neutralization of E2-CD81-claudin-1 associations. *Hepatology* **51**, 1144-1157 (2010).
55. Kapadia, S.B., Barth, H., Baumert, T., McKeating, J.A. & Chisari, F.V. 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 (2007).
56. Zhong, J., *et al.* Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 9294-9299 (2005).
57. Lindenbach, B.D., *et al.* Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* **309**, 623-626 (2005).
58. Haid, S., Windisch, M.P., Bartenschlager, R. & Pietschmann, T. Mouse-specific residues of claudin-1 limit hepatitis C virus genotype 2a infection in a human hepatocyte cell line. *J. Virol.* **84**, 964-975 (2010).
59. Ciesek, S., *et al.* Glucocorticosteroids increase cell entry by hepatitis C virus. *Gastroenterology* **138**, 1875-1884 (2010).
60. Barth, H., *et al.* Scavenger receptor class B is required for hepatitis C virus uptake and cross-presentation by human dendritic cells. *J. Virol.* **82**, 3466-3479 (2008).
61. Casato, M., *et al.* Predictors of long-term response to high-dose interferon therapy in type II cryoglobulinemia associated with hepatitis C virus infection. *Blood* **90**, 3865-3873 (1997).



62. Haberstroh, A., *et al.* Neutralizing host responses in hepatitis C virus infection target viral entry at postbinding steps and membrane fusion. *Gastroenterology* **135**, 1719-1728 e1711 (2008).
63. Koutsoudakis, G., *et al.* Characterization of the early steps of hepatitis C virus infection by using luciferase reporter viruses. *J. Virol.* **80**, 5308-5320 (2006).
64. Pestka, J.M., *et al.* Rapid induction of virus-neutralizing antibodies and viral clearance in a single-source outbreak of hepatitis C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 6025-6030 (2007).
65. Miura, K., Nam, J.M., Kojima, C., Mochizuki, N. & Sabe, H. EphA2 engages Git1 to suppress Arf6 activity modulating epithelial cell-cell contacts. *Mol. Biol. Cell* **20**, 1949-1959 (2009).

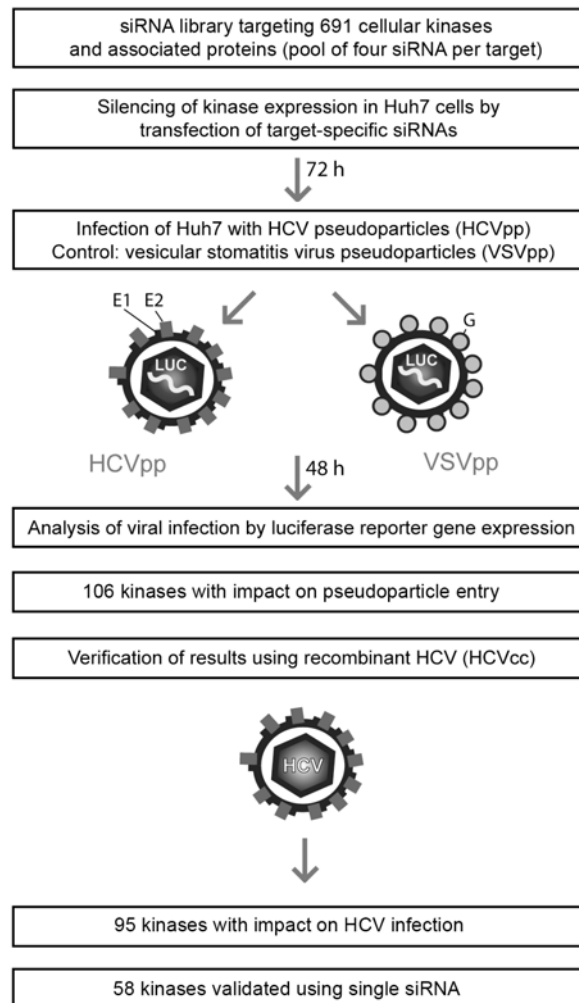
**SUPPLEMENTARY TABLE LEGENDS**

The contents of **Supplementary Tables 1** and **2** are provided as datasets in the online supplementary information.

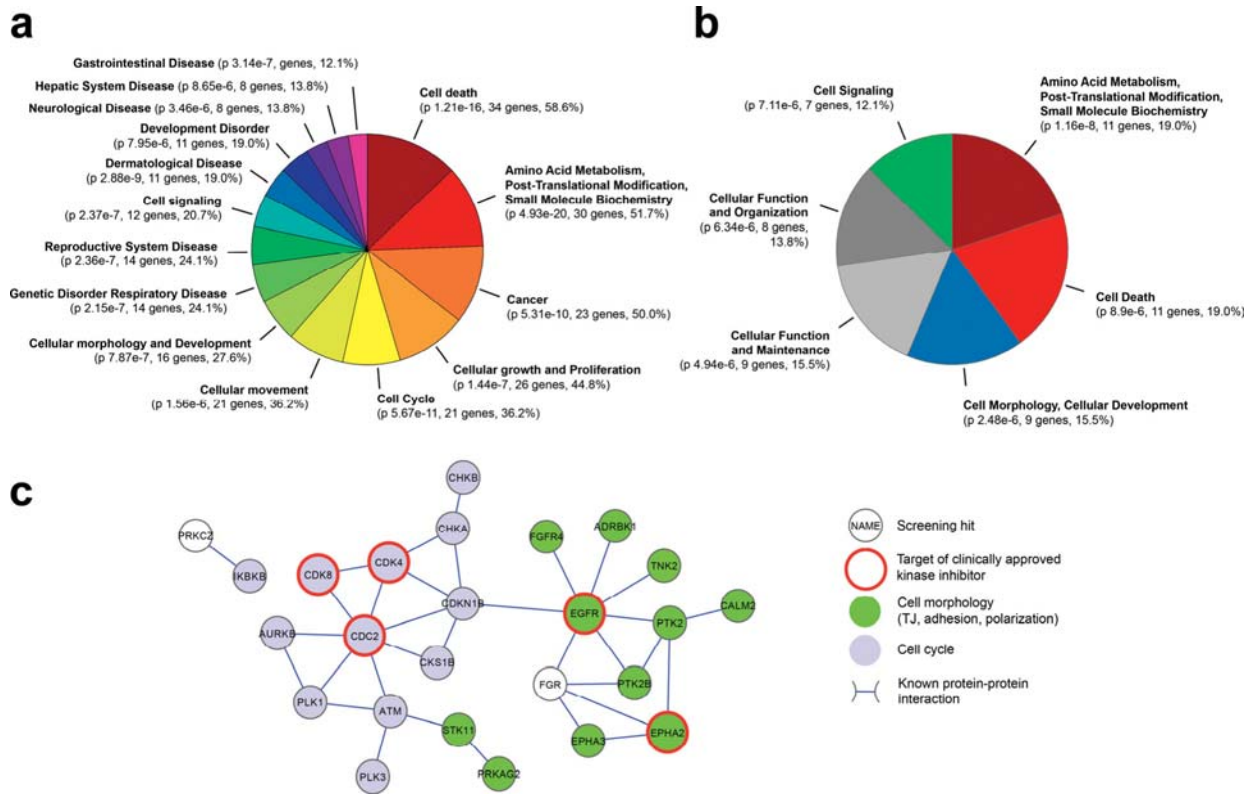
**Supplementary Table 1. Effect of silencing of 691 cellular kinases and associated proteins on HCVpp and VSVpp entry (primary screen).** Using the Human Kinase RNAi Set Version 2.0 (pool of four siRNAs, Qiagen) and the Huh7–HCVpp system as a high–throughput model system for HCV entry we determined the impact of kinase gene silencing on entry of HCVpp (H77; genotype 1a) and VSVpp. Results are expressed as fold change of particle entry caused by gene silencing compared to particle entry into control siRNA–transfected cells (fold change =  $-1/\text{fold infection}$ , if the entry was reduced after kinase silencing; e.g. 50% decreased particle entry equals a fold infection of 0.5 and fold change of  $-2$ ; e.g. 50% increased particle entry equals a fold infection of 1.5 and fold change of 1.5). Local false discovery rates (fdr) for each gene were determined using fdr analysis. Fdr threshold for hit selection (HCVpp entry) was  $<0.001$ , fdr threshold for HCV specificity (VSVpp entry) was  $<0.08$ . We identified a panel of 106 cellular kinases chosen for further validation (highlighted in yellow). Silencing of 42 kinases only decreased HCVpp infection (column J “HCV”) but did not inhibit entry of VSVpp. Silencing of 64 kinases inhibited both HCVpp and VSVpp entry (column J “HCV+VSV”). For verification, we re–analyzed the screening results using  $\geq 2$  s.d. from the plate mean as measure of threshold for hit selection (average measure) (the analysis strategy used by Brass et al.<sup>2</sup>). Using this method at least the same kinases would have been identified for subsequent validation screening (column K).

**Supplementary Table 2. Cellular kinases modulating HCV entry identified by the RNAi kinase screen.** Using the Human Kinase RNAi Set Version 2.0 (Qiagen), four individual siRNAs per target, we determined the impact of gene silencing on HCVpp, VSVpp and HCVcc infection and on cell viability (MTT). Results are expressed as fold change of pseudoparticle entry in cells with silenced kinase expression compared to control siRNA-transfected cells (fold change =  $-1/\text{fold infection}$ , if the entry was reduced after kinase silencing; e. g. 50% decreased particle entry equals a fold infection of 0.5 and fold change of  $-2$ ; e. g. 50% increased particle entry equals a fold infection of 1.5 and fold change of 1.5). Local false discovery rates (fdr) and p-values for each gene were determined using fdr analysis. Following statistical analysis of the results from the primary and secondary screens and validation with individual siRNAs, we identified a panel of 58 cellular kinases exhibiting a significant (**Supplementary Methods**) impact on HCV entry and HCVcc infection that were validated by at least 2 of four individual siRNA. 18 kinases had an impact on HCV entry but not on entry of VSV (highlighted in blue). Kinase expression in liver was confirmed by GeneAtlas database (BioGPS, Novartis Research Foundation, <http://biogps.gnf.org>) and indicated in column N: relative gene expression is + = lower, ++ = higher, +++ = 3 fold higher, ++++ = 10 fold higher than the median expression in all investigated tissues (>60).

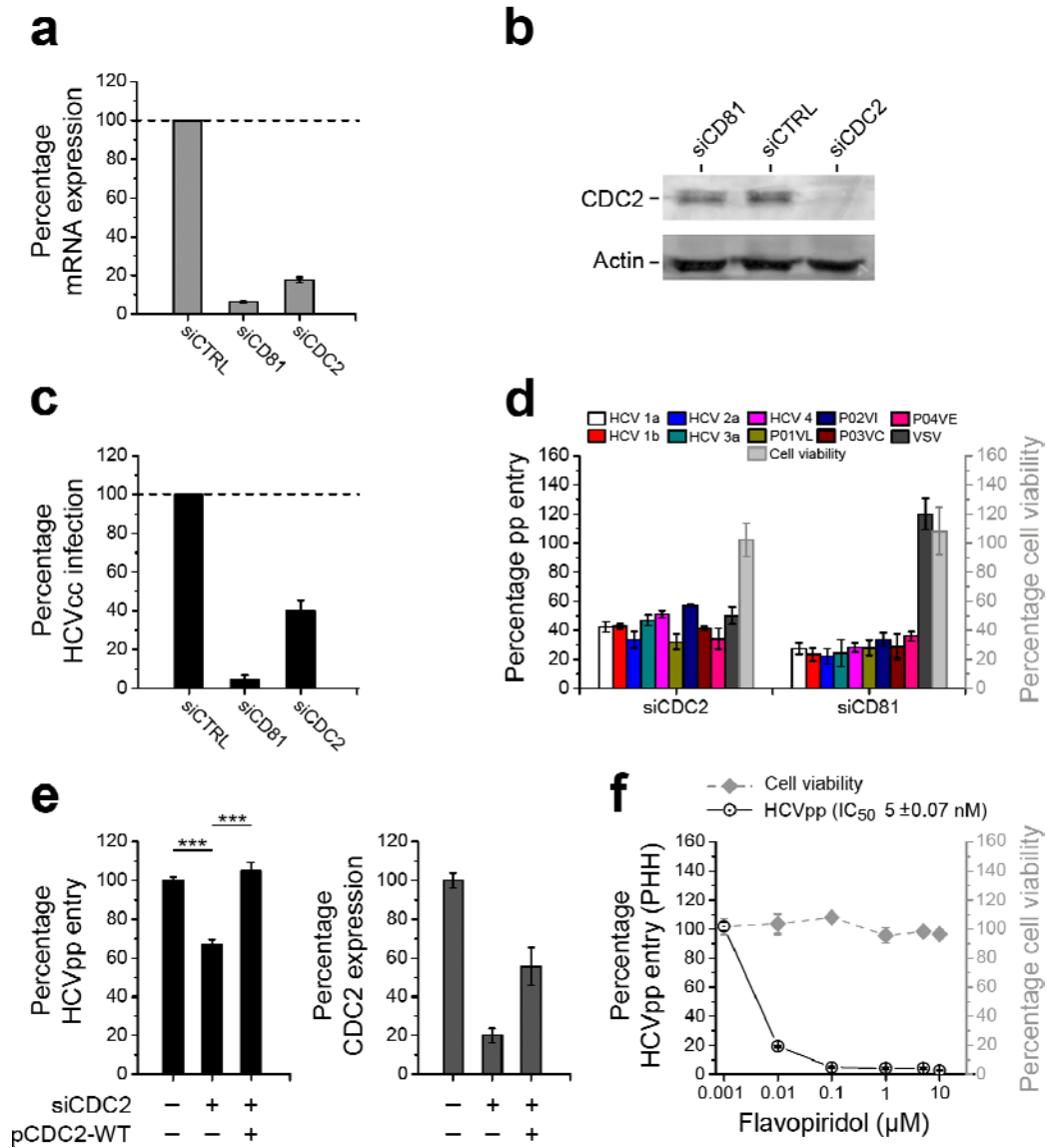
## SUPPLEMENTARY FIGURES



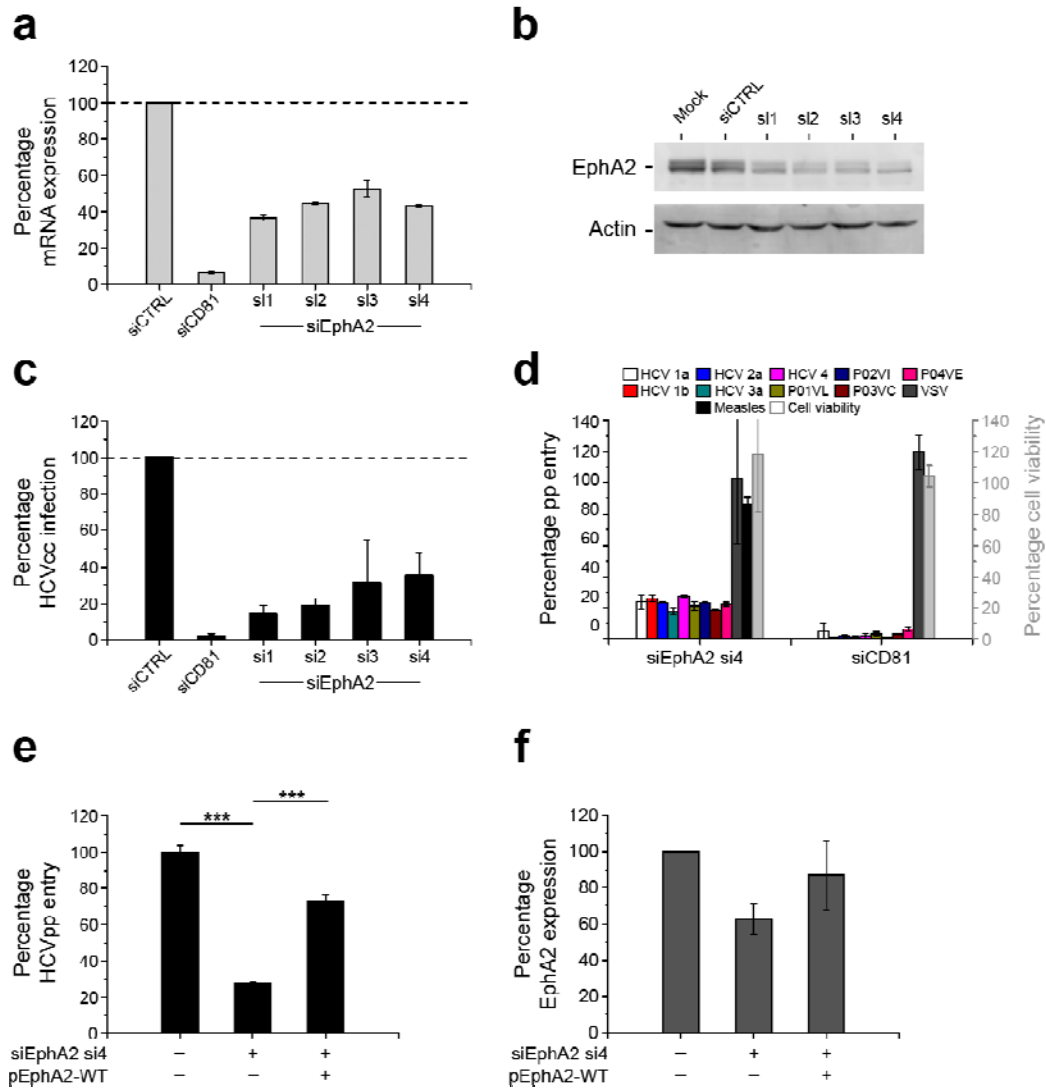
**Supplementary Fig. 1. Schematic outline of the functional RNAi HCVpp entry screen used to identify HCV entry factors.** Protein kinase expression was silenced in Huh7 hepatoma cells by target-specific siRNAs. Retroviral HCV pseudotyped particles (HCVpp) bearing HCV envelope glycoproteins (E1, E2) on their viral surface and harboring a luciferase reporter gene were used to analyze the impact of gene silencing on HCV entry into Huh7 cells. A decrease or increase in luciferase expression compared to the control siRNA-transfected cells indicated modulation of HCVpp entry by the corresponding target gene or genes. The effects of gene silencing on the infection of vesicular stomatitis virus derived pseudoparticles (VSVpp) were studied in side-by-side experiments. A RNAi library consisting of 691 siRNA pools was used to screen for cellular kinases and associated proteins with impact on entry of HCVpp. 106 candidates were identified in the primary RNAi screen. Pertinence to the infectious viral life cycle was verified for 95 candidate genes using recombinant HCVcc. 58 cellular kinases were validated by at least 2 individual siRNAs, thereby minimizing false positive hit selection due to off-target effects.



**Supplementary Fig. 2. Biological process and protein association network analyses of the identified cellular kinases with marked impact on HCV entry.** (a) The 58 identified cellular kinases involved in HCV entry and (b) the 18 identified kinases with impact on HCV but not on VSV entry were analyzed using the Ingenuity Pathways database. This analysis identified terms with the most prevalent biological processes associated with the identified candidate kinases within an organism (threshold  $P < 10^{-5}$ ). The most significant terms of biological function were listed in the order of percentage frequency. (c) Protein association network of the 58 kinases involved in HCV entry identified by STRING analysis. Lines connecting kinases show direct (physical) and indirect (functional) associations derived from numerous sources, including experimental repositories, computational prediction methods and public text collections<sup>6</sup>. Kinases targeted by clinical licensed PKIs (red circles), kinases involved in the regulation of cell morphology including tight junctions, adhesion, cell polarity (green), cell cycle progression (blue) are highlighted.

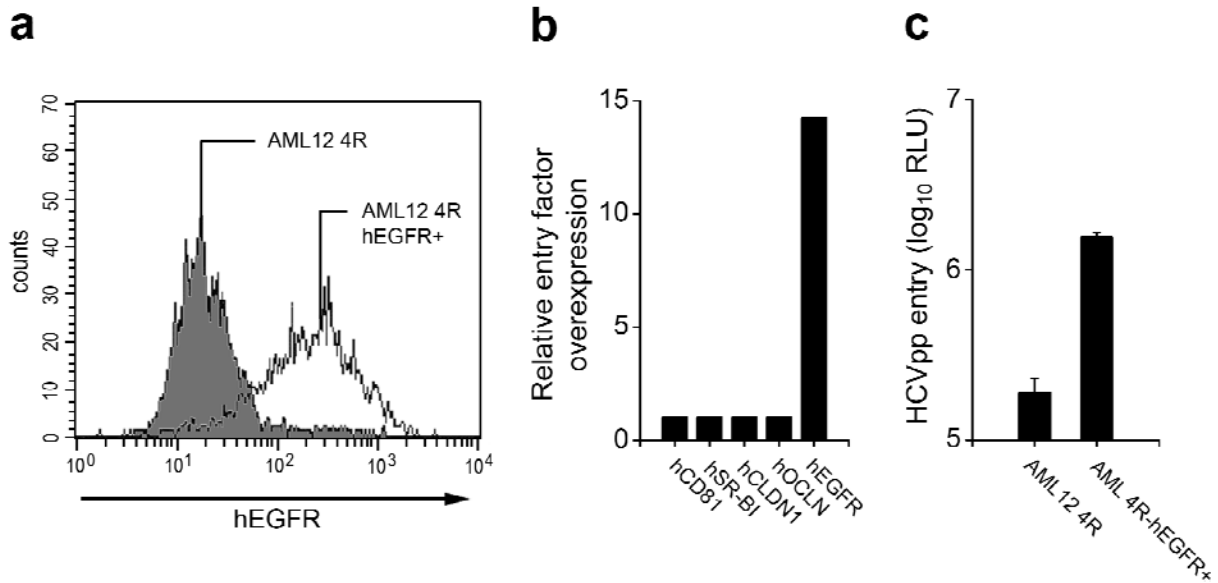


**Supplementary Fig. 3. Cell division cycle 2 kinase (CDC2) is a co-factor for HCV entry.** (a) Silencing of CDC2 expression in HCV permissive cells. (a) CDC2 mRNA (quantification by qRT-PCR relative to GAPDH mRNA) and (b) protein expression (Western blot) in Huh7.5.1 cells transfected with an individual CDC2-specific siRNA compared to control siRNA (siCTRL) is shown. Silencing of CD81 expression by CD81-specific siRNA served as control. (c) HCVcc infection in Huh7.5.1 cells with silenced CDC2 expression (as shown in panels a,b). (d) Entry of HCVpp containing envelope glycoproteins of various isolates<sup>27,64</sup> in Huh7.5.1 cells with silenced CDC2 expression (as shown in panels a,b). Data are expressed as percent pp entry relative to siCTRL-transfected cells. Cell viability in siCDC2-treated cells assessed using MTT test is shown as mean ± SEM. (e) Rescue of HCV entry in cells with silenced CDC2 expression by exogenous CDC2. HCVpp entry and CDC2 protein expression in Huh7.5.1 cells co-transfected with CDC2-specific siRNA and cDNA encoding for RNAi-resistant CDC2 is shown. Different transfection protocols (poly-cationic transfection (a-d) versus electroporation (e)) are responsible for the apparent differences in Hs-CDC2<sub>14</sub>-siRNA efficacy on reducing HCVpp entry. Protein expression was quantified using Image Quant analysis of Western blots. Data are expressed as percentage HCVpp entry relative to CTRL cells or as percentage CDC2 expression normalized for β-actin expression (means ± SEM). \*\*\*  $P < 0.0005$ . (f) Effect of Flavopiridol, a CDC2-inhibitor, on HCVpp entry into PHH. Cell viability was assessed using MTT assay.

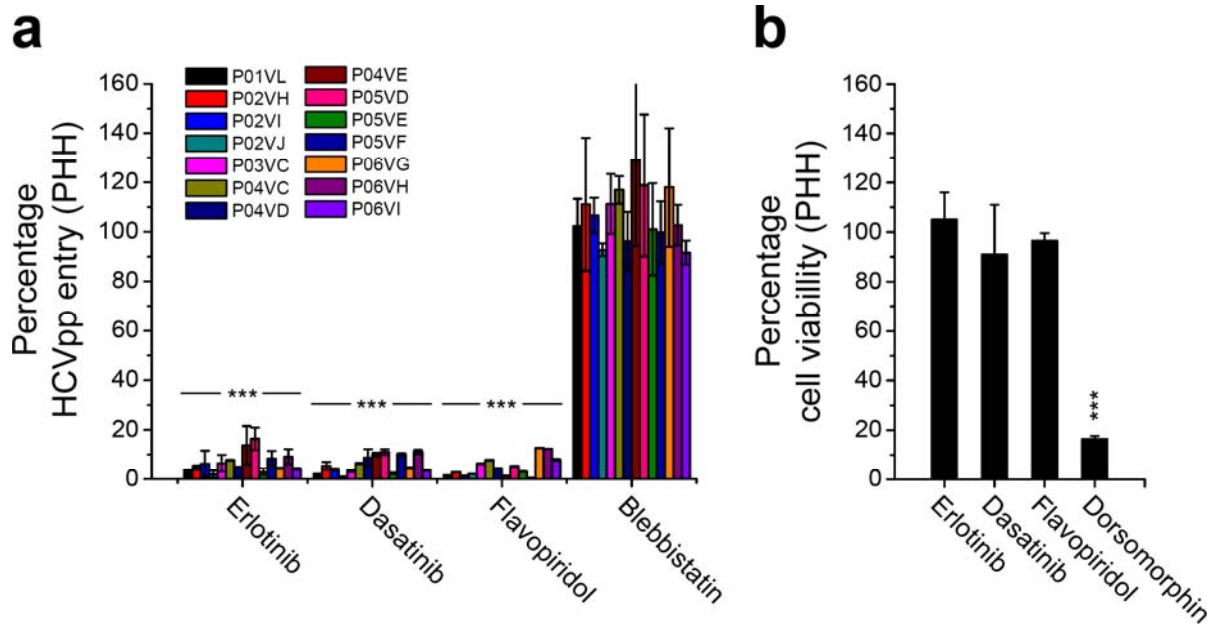


**Supplementary Fig. 4. Ephrin receptor A2 (EphA2) is a co-factor for HCV entry.** (a,b) Silencing of EphA2 expression in HCV permissive cells. (a) EphA2 mRNA (qRT-PCR analysis) and (b) protein expression (Western blot) in Huh7.5.1 cells transfected with EphA2-specific individual siRNAs (si1-si4). Silencing of CD81 mRNA expression by CD81-specific siRNA served as control. EphA2 mRNA (relative to GAPDH mRNA) and protein expression compared to cells transfected with control siRNA (siCTRL) is shown. (c,d) Inhibition of HCV infection and entry in cells with silenced EphA2 expression. (c) HCVcc infection in Huh7.5.1 cells transfected with individual siRNAs shown in panels a,b. siCTRL and CD81-specific siRNA served as internal controls. Data are expressed as percent HCVcc infection relative to siCTRL-transfected cells. (d) Entry of HCVpp containing envelope glycoproteins of various isolates in Huh7.5.1 cells transfected with siRNA si4. Analysis of VSV and measles virus pp entry or cells transfected with siCD81 served as controls. Data are expressed as percentage pp entry relative to siCTRL-transfected cells. (d,e) Rescue of HCV entry in cells with silenced EphA2 expression by exogenous EphA2. HCVpp entry (e) and EphA2 protein expression (f) in Huh7.5.1 cells co-transfected with EphA2-specific individual siRNA si4 and a cDNA encoding for siRNA si4-resistant EphA2 (pEphA2-WT)<sup>51</sup>. Protein expression was quantified using Image Quant analysis of Western blots. Data are expressed as percentage HCVpp entry relative to CTRL cells or as percentage EphA2 expression normalized for  $\beta$ -actin expression. \*\*\*  $P < 0.0005$ .

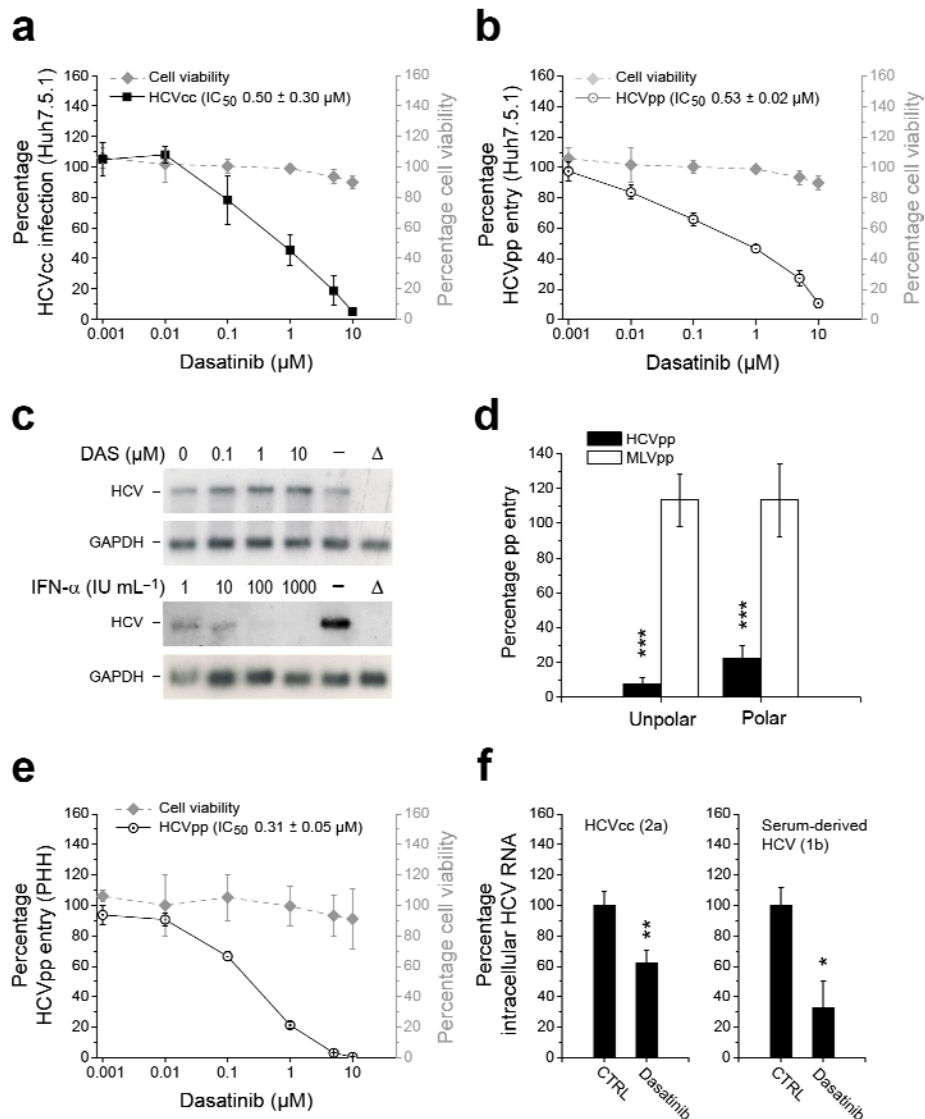




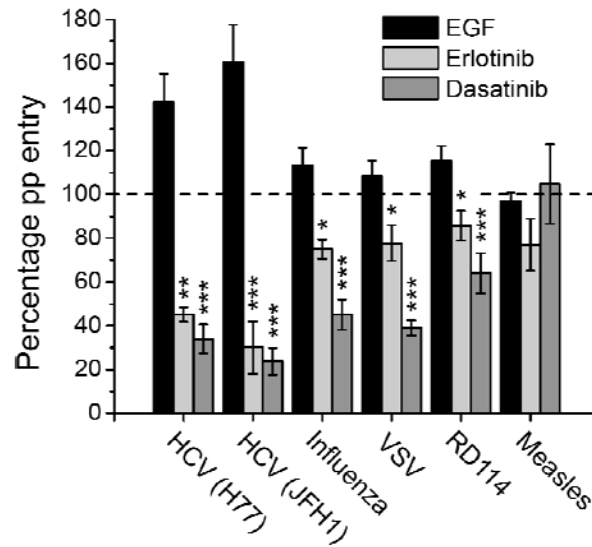
**Supplementary Fig. 5. Expression of human EGFR enhances HCV entry into HCVpp permissive mouse hepatoma cells expressing human entry factors.** Mouse hepatoma AML12 4R cells stably expressing human entry factors CD81, SR-BI, CLDN1, and OCLN were transduced with lentiviruses expressing human EGFR–L858R (hEGFR)<sup>50</sup>. Cell surface hEGFR expression (**a**) assessed by flow cytometry and (**b**) human CD81, SR-BI, CLDN1, OCLN and EGFR expression shown as fold expression relative to mock transduced AML12 4R cells. (**c**) HCVpp entry into mouse hepatoma cells engineered to express human EGFR. HCVpp entry was quantified in AML12 4R and AML12 4R–hEGFR+ cells in side-by-side experiments. Results are expressed as relative light units (RLU).



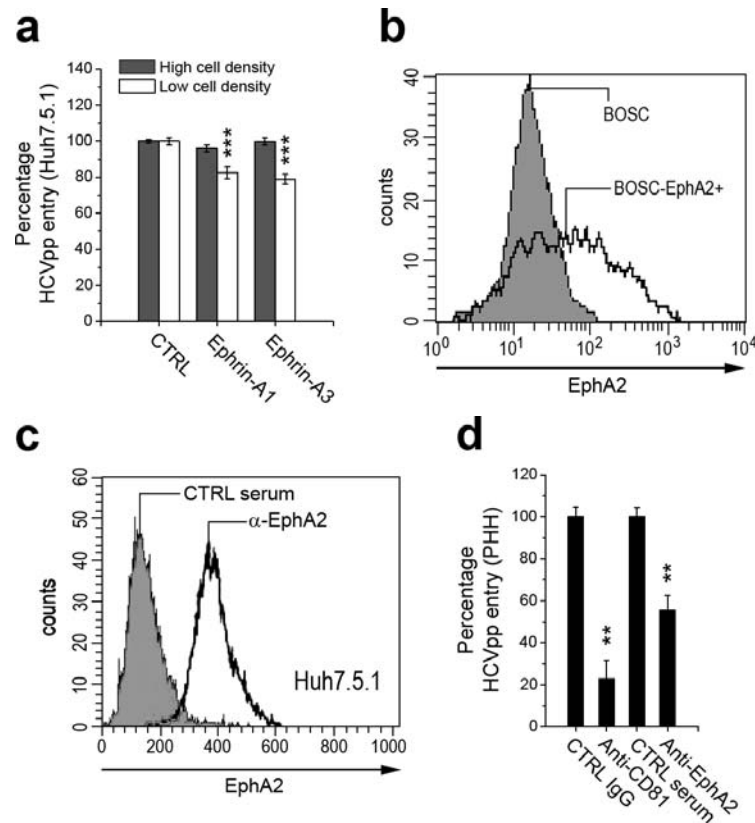
**Supplementary Fig. 6. Erlotinib, Dasatinib, and Flavopiridol inhibit entry of HCV escape variants which are resistant to autologous host immune responses.** HIV-based HCVpp bearing envelope glycoproteins from HCV escape variants P01VL, P02VH, P02VI, P02VJ, P03VC, P04VC, P04VD, P04VE, P05VD, P05VE, P05VF, P06VG, P06VH, P06VI isolated during liver transplantation from six different HCV-infected patients<sup>27</sup> were produced as described (**Supplementary Methods**)<sup>27</sup>. **(a)** Effect of *Dasatinib*, *Erlotinib*, or *Flavopiridol* on entry of HCV escape variants. HCVpp entry into PHH pre-incubated with PKIs (10  $\mu$ M) is shown. Incubation of cells with *Blebbistatin* (10  $\mu$ M) served as negative control. **(b)** Analysis of cell viability in PKI-treated cells. Cell viability was assessed by MTT assay. Incubation with *Dorsomorphin* (10  $\mu$ M), an unrelated PKI, served as positive control for cell viability. \*\*\*,  $P < 0.0005$ .



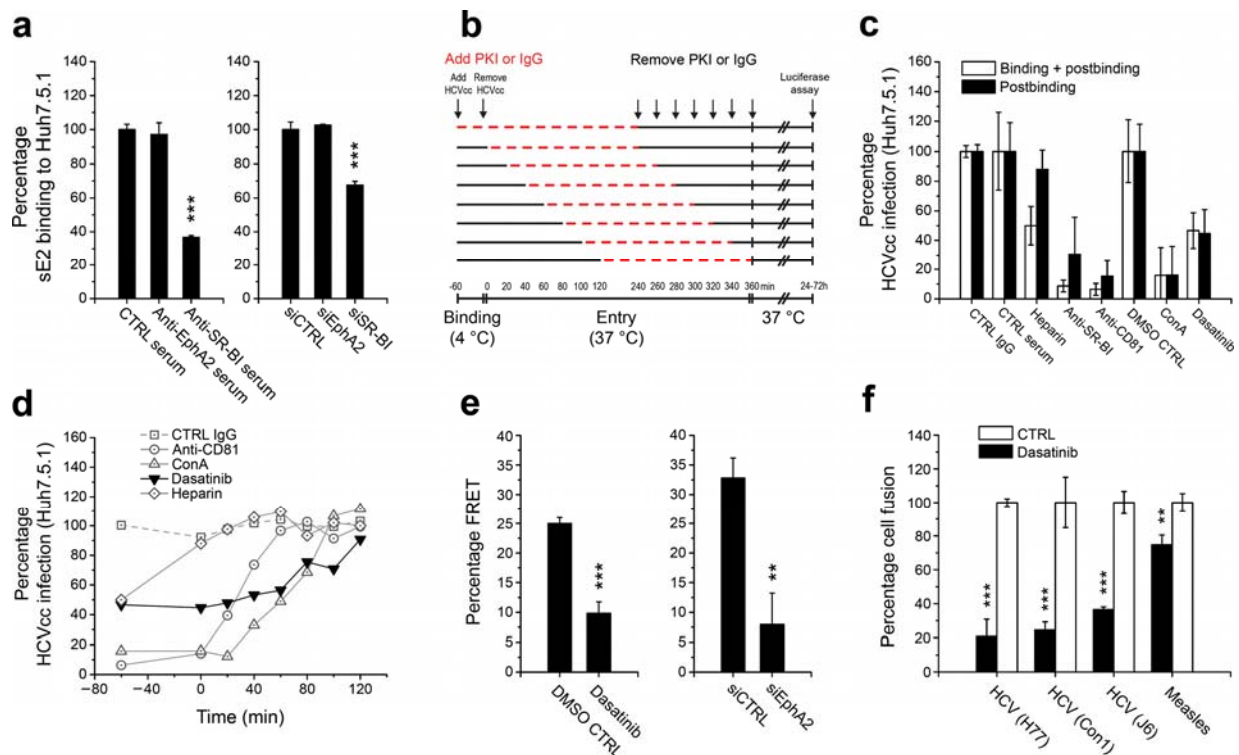
**Supplementary Fig. 7. Dose-dependent inhibition of HCV entry and infection by *Dasatinib* – a clinically approved inhibitor of EphA2 kinase.** (a,b) Effect of *Dasatinib* on HCVpp entry and HCVcc infection. (a) HCVcc infection and (b) HCVpp entry in *Dasatinib*- or CTRL-treated Huh7.5.1 cells was assessed as described<sup>27,40</sup>. Cell viability was assessed using MTT assay. IC<sub>50</sub> values are expressed as median of three independent experiments ± standard error of the median. (c) Effect of *Dasatinib* on HCV replication. Following electroporation with HCV RNA from the subgenomic HCV JFH1 replicon or replication incompetent HCV RNA (GND, Δ) Huh7.5 cells were incubated with solvent CTRL, *Dasatinib*, or interferon-α (IFN-α-2a) at the indicated concentrations. HCV RNA and GAPDH mRNA were analyzed by Northern blot. (d) Effect of *Dasatinib* on HCVpp entry into polarized HepG2-CD81 cells. HCVpp and MLVpp entry was analyzed in non-polarized and polarized HepG2-CD81 cells pre-incubated with *Dasatinib* (means ± SEM). (e) Effect of *Dasatinib* on HCVpp entry into PHH. HCVpp entry was assessed in PHH pre-treated with *Dasatinib*. Viability of treated cells was assessed using MTT assay. IC<sub>50</sub> values are expressed as median of three independent experiments ± standard error of the median. (f) Effect of *Dasatinib* on HCV infection of PHH. Intracellular HCV RNA in PHH infected with HCVcc<sup>59</sup> or serum-derived HCV<sup>40</sup> in *Dasatinib* or solvent CTRL-treated PHH was analyzed by qRT-PCR<sup>40</sup>. Cell viability was assessed using MTT assay. \*,  $P < 0.05$ , \*\*,  $P < 0.005$ ; \*\*\*,  $P < 0.0005$ . Unless otherwise indicated: *Dasatinib* 10 μM.



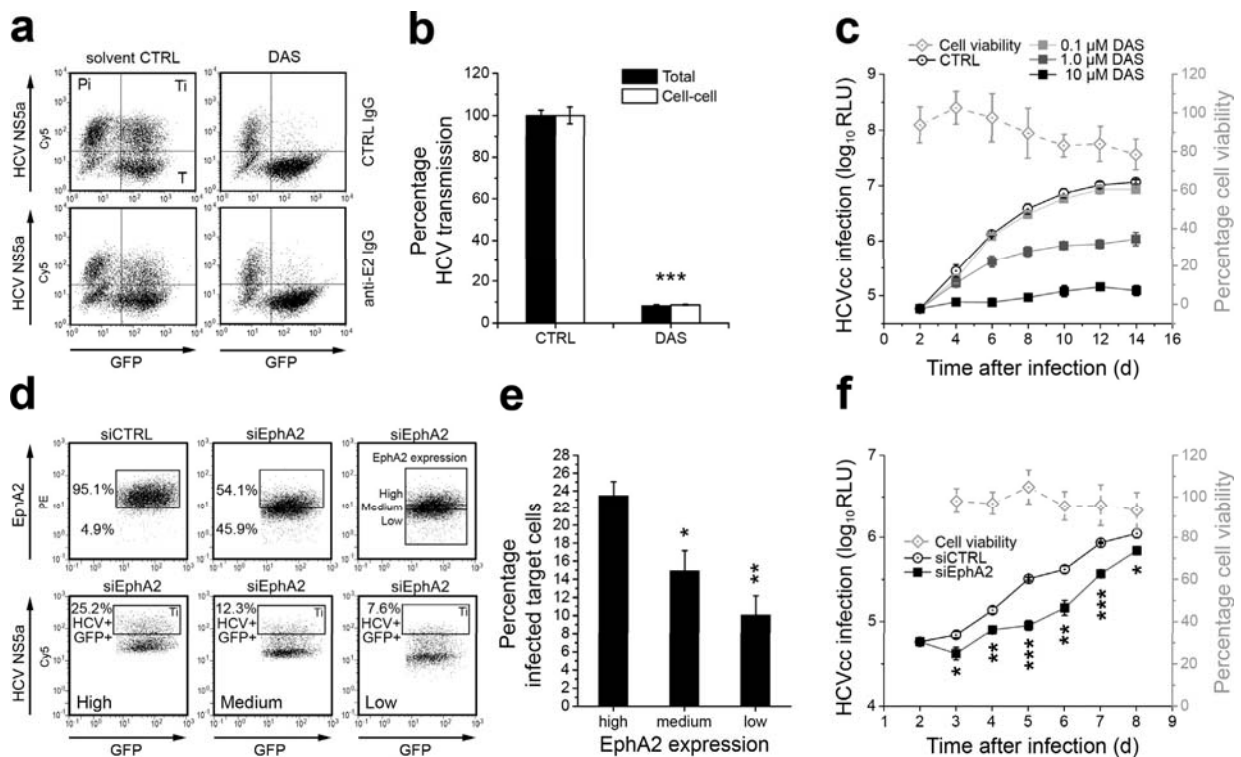
**Supplementary Fig. 8. Effect of EGF and PKIs on entry of pseudoviruses expressing envelope proteins from HCV, VSV, influenza, measles and feline leukemia virus.** Infection of serum-starved Huh7.5 cells incubated with EGF ( $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) or PKI ( $10 \mu\text{M}$ ) with pseudotyped particles expressing envelope glycoproteins from HCV strains H77 and JFH1, influenza, vesicular stomatitis virus (VSV), endogenous feline leukemia virus (RD114) and measles virus. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.005$ ; \*\*\*,  $P < 0.0005$ .



**Supplementary Fig. 9. EphA2-specific ligands and antibodies modulate HCV entry.** (a) Effect of EphA2-specific ligands ephrin-A1 and -A3 and cell-density on HCVpp entry. HCVpp entry into cells seeded at high or low density treated with  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  soluble Fc-tagged ephrin-A1 and -A3 or Fc-tag (CTRL)<sup>65</sup> is shown. (b) Specific binding of rat serum to human EphA2 (dilution 1:5,000) to cell surface human EphA2 expressed on BOSC cells. Flow cytometric analysis of BOSC cells transfected with a human EphA2 expression construct (non shaded histograms; “BOSC-EphA2+”) or a an empty control vector (pcDNA3; “BOSC”, grey histograms)<sup>54</sup>. (c) Specific binding of EphA2-specific serum (dilution 1:100) to native EphA2 expressed on the surface of Huh7.5.1 cells. Flow cytometric analysis of non-permeabilized Huh7.5.1 cells incubated with EphA2-specific (non shaded histograms) or control serum (grey histograms) is shown. (d) Effect of EphA2-specific serum on HCVpp entry into PHH. HCVpp entry into PHH in the presence or absence of antibody to CD81 ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) or serum to EphA2 (dilution 1:50) is shown. \*\*,  $P < 0.005$ ; \*\*\*,  $P < 0.0005$ .

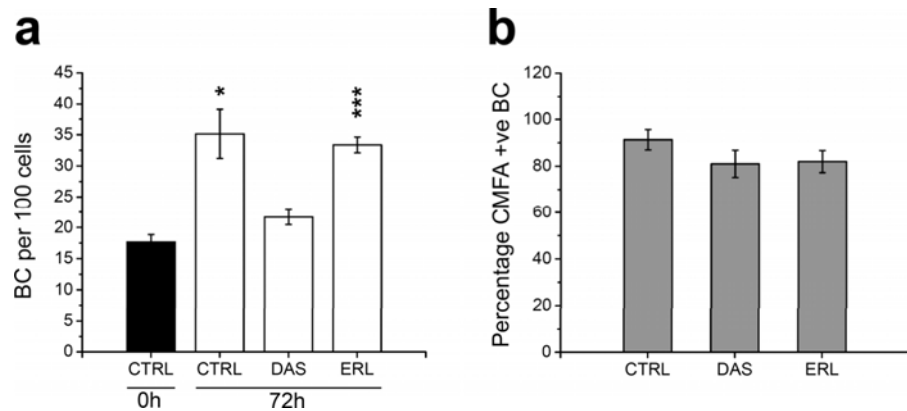


**Supplementary Fig. 10. EphA2 mediates entry at a postbinding step by promoting the formation of CD81–CLDN1 co-receptor association(s).** (a) EphA2 and binding of soluble HCV glycoprotein sE2 to HCV permissive cells. sE2 binding to Huh7.5.1 cells incubated with EphA2-specific serum or siEphA2 were analyzed by flow cytometry. SR–BI-specific antibodies and SR–BI silencing served as positive controls (all antibodies diluted at 1:100). (b,c) Effect of *Dasatinib* on HCV binding and postbinding steps. (b) Experimental setup. After HCVcc binding to Huh7.5.1 cells for 1 h at 4 °C in the presence or absence of antibodies, where HCVcc bind to the cells but do not efficiently enter, the inoculum is removed and the cells are shifted to 37 °C to allow synchronous viral entry<sup>48,54,62,63</sup>. Dashed lines indicate the presence of compounds. Data are expressed relative to HCVcc infection without compound. (c) To discriminate between virus binding and postbinding events, HCVcc binding to Huh7.5.1 cells was performed in the presence or absence of indicated compounds at 4 °C, before cells were washed and incubated with compounds at 37 °C. (d) HCV entry kinetics. Time-course of HCVcc infection of Huh7.5.1 cells following addition of the indicated compounds at different time-points during infection (**Supplementary Methods**). (e) Effect of *Dasatinib* and EphA2 silencing on CD81–CLDN1 association(s). FRET of CD81–CLDN1 co-receptor associations in HepG2–CD81 cells incubated with *Dasatinib* or EphA2-specific siRNA are shown (means ± SEM). (f) Effect of *Dasatinib* on membrane fusion. Viral glycoprotein-dependent fusion of 293T cells with Huh7 cells pre-incubated with *Dasatinib* or control is shown. \*\*,  $P < 0.005$ ; \*\*\*,  $P < 0.0005$ . *Dasatinib*: 10 μM.



**Supplementary Fig. 11. EphA2 plays a functional role in HCV cell-cell transmission and spread.** The experimental set-up of the HCV cell-cell transmission assay is described in **Fig. 5**. **(a)** Relative quantification of HCV-infected target cells (Ti) after co-cultivation with HCV producer cells (Pi) during *Dasatinib* treatment in the absence (cell-free and cell-cell transmission) and presence (cell-cell transmission) of HCV E2-specific antibody. **(b)** Total and cell-cell transmission were defined as HCV infection of Huh7.5-GFP+ target cells (Ti) in the absence (total transmission, black bars) or presence (cell-cell transmission, white bars) of HCV E2-specific antibody. **(c)** Effect of *Dasatinib* on viral spread. Long-term HCVcc infection of Huh7.5.1 cells incubated with *Dasatinib* 48 h post-infection at the indicated concentrations. Medium with solvent (CTRL) or PKI was replenished every 2nd day. Cell viability was assessed using MTT test. **(d)** EphA2 expression in target cells with silenced EphA2 expression. Cell surface EphA2 expression was analyzed by flow cytometry and target cells were divided in three groups displaying high, medium and low EphA2 expression. **(e)** Cell-cell transmission in HCV-infected GFP+ target cells with high, medium and low EphA2 expression was quantified by flow cytometry as described in **Fig. 5**. **(f)** Effect of EphA2 silencing on viral spread. Long-term analysis of HCVcc infection in Huh7.5.1 transfected with EphA2-specific or control siRNA 24 h post-infection. Cell viability was assessed using MTT test. DAS= *Dasatinib* 10 μM (unless otherwise stated). \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.005$ ; \*\*\*,  $P < 0.0005$ .





**Supplementary Fig. 12. Effect of PKIs on polarization and tight junction integrity of HCV permissive HepG2-CD81 cells.** (a) Polarity in HepG2-CD81 cells incubated with PKIs. HepG2-CD81 cells were incubated in the presence of *Erlotinib* or *Dasatinib* for 72 h, fixed in 3% paraformaldehyde and stained for bile canaliculi (BC) that expressed marker MRP2. The polarity index (BC per 100 cells) was assessed by quantifying the number of MRP2 positive BC per 100 cell nuclei for five fields of view on 3 replicate cover slips. (b) Tight junction (TJ) integrity in HepG2-CD81 cells incubated with PKIs. TJ integrity was assessed after 72 h PKI treatment by determining the frequency of BC retaining marker dye CMFDA as described previously<sup>18</sup>. Means  $\pm$  SEM are shown. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*\*,  $P < 0.0005$ . PKI: 10  $\mu$ M, DAS= *Dasatinib*, ERL= *Erlotinib*.

## Caractérisation fonctionnelle des interactions virus-kinases lors de l'entrée cellulaire du virus de l'hépatite C

### Résumé

Le virus de l'hépatite C (HCV) est une cause majeure de maladie chronique du foie et de carcinome hépatocellulaire. Les options thérapeutiques pour traiter l'hépatite chronique sont limitées par des coûts élevés, des effets secondaires et une résistance virale. L'entrée du HCV est la première étape d'interaction entre le virus et la cellule hôte. Elle est requise pour l'initiation, la propagation et le maintien de l'infection, ce qui en fait une cible prometteuse pour les traitements antiviraux. L'entrée du HCV nécessite l'interaction coopérative de plusieurs facteurs cellulaires, y compris CD81 et claudine-1 (CLDN1). Nous avons récemment identifié un rôle pour le récepteur à l'EGF (EGFR) et le récepteur à l'ephrine A2 (EphA2) dans l'entrée du HCV par la régulation de la formation du complexe de co-récepteurs CD81-CLDN1, ce qui suggère que la signalisation de ces récepteurs joue un rôle dans l'entrée du virus. Nous avons voulu identifier les mécanismes moléculaires de signalisation de l'EGFR requis pour l'entrée du HCV et avons identifié HRas comme un transducteur de signalisation clé de l'hôte. Des études d'imagerie ont révélées que la signalisation de HRas peut moduler la diffusion et le trafic membranaire de CD81, ce qui permet l'assemblage du complexe de récepteurs. De plus, HRas s'associe avec les récepteurs de l'hôte CD81 et CLDN1 et des facteurs d'entrée du HCV inconnus jusque là: l'intégrine beta1 et Rap2B. Le HCV profite donc de la signalisation de HRas pour l'entrée cellulaire. Ces données améliorent notre compréhension des mécanismes moléculaires de l'entrée du HCV induite par l'EGFR et ouvrent de nouvelles perspectives pour le développement d'antiviraux.

Mots-clés : virus de l'hépatite C (HCV), foie, infection, entrée virale, récepteur à l'EGF (EGFR), GTPase HRas, antiviral, signalisation cellulaire

### Summary

Hepatitis C virus (HCV) is a major cause of chronic liver disease and hepatocellular carcinoma worldwide. Therapeutic options to treat chronic viral hepatitis are limited by high costs, side effects and viral resistance in most patients. HCV entry is the first step of interaction between the virus and the host cell. It is required for the initiation, propagation and maintenance of infection, making it a promising target for antiviral therapy. HCV entry requires the cooperative interaction of several cellular factors, including CD81 and claudin-1 (CLDN1). We have recently identified a role for EGF receptor (EGFR) and ephrin receptor A2 (EphA2) in HCV entry by regulating the formation of the co-receptor complex CD81-CLDN1, suggesting that the signaling of these receptors might play a role in viral entry. However, the precise mechanisms of regulation are unknown. We wanted to identify the molecular mechanisms of EGFR signaling required for the HCV entry process. We identify HRas as key host signaling transducer for HCV entry. Advanced imaging studies have revealed that HRas signaling can modulate the lateral diffusion and membrane trafficking of CD81. A modified diffusion of CD81 allows the assembly of the receptors complex. In addition, HRas associates with tetraspanin microdomains containing the host receptors CD81 and CLDN1 and HCV entry factors previously unknown: the integrin beta1 and Rap2B. HCV therefore exploits HRas signaling for cellular entry. These data improve our understanding of the molecular mechanisms of HCV entry induced by EGFR and open new perspectives for the development of antivirals targeting signaling pathways.

Key words: hepatitis C virus (HCV), liver, infection, viral entry, EGF receptor (EGFR), HRas GTPase, antiviral, cell signaling