



**HAL**  
open science

# Étude in vitro de l'association du virus de l'hépatite C avec les lipoprotéines de l'hôte

Baptiste Jammart

► **To cite this version:**

Baptiste Jammart. Étude in vitro de l'association du virus de l'hépatite C avec les lipoprotéines de l'hôte. Biologie cellulaire. Université Claude Bernard - Lyon I, 2012. Français. NNT : 2012LYO10082 . tel-01127541

**HAL Id: tel-01127541**

**<https://theses.hal.science/tel-01127541>**

Submitted on 7 Mar 2015

**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.

# Thèse de doctorat de l'Université de Lyon

Délivrée par

L'Université Claude Bernard Lyon I

Ecole doctorale de Biologie Moléculaire  
Intégrative et Cellulaire (ED 340)

Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon  
(INSERM U1052, CNRS 5286)

## **Etude *in vitro* de l'association du virus de l'hépatite C avec les lipoprotéines de l'hôte.**

Présentée par

**Baptiste Jammart**

Pour l'obtention du diplôme de  
Docteur de l'Université Claude Bernard Lyon I

Et soutenue publiquement le 21 Juin 2012  
devant un jury composé de :

**Pr. Agnès Girard-Egrot**

*Président du jury*

**Dr. Jean Dubuisson**

*Rapporteur*

**Dr. Jean-Christophe Meunier**

*Rapporteur*

**Dr. Patrick Maurel**

*Examineur*

**Dr. François-Loïc Cosset**

*Examineur*

**Dr. David Durantel**

*Directeur de thèse*



# **Thèse de Virologie**

de

**Baptiste Jammart**

Réalisée au sein du

**Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon**

UMR INSERM U1052 CNRS 5286

Equipe 15 (Pr. Fabien Zoulim, Dr. Lucyna Cova)

Mécanismes de la pathogénèse de l'hépatite B et C  
chronique et nouvelles stratégies antivirales

151, cours Albert Thomas - 69424 Lyon cedex 03

Sous la supervision du

**Dr. David Durantel**

Et financée par

**Ministère de l'Enseignement Supérieur  
et de la Recherche**

**Association pour la Recherche sur le Cancer**

**Université de Lyon (DEVweCAN)**



**Baptiste Jammart**

## **Etude *in vitro* de l'association du virus de l'hépatite C avec les lipoprotéines de l'hôte.**

### **Résumé**

Le virus de l'hépatite C (HCV) infecte les hépatocytes. Il est remarquable par le fait qu'il perturbe fortement le métabolisme lipidique de l'hôte, conduisant à des dysfonctions majeures telles qu'une stéatose ou une résistance à l'insuline. *In vivo*, les virions sériques présentent une densité faible et variable reflétant leur association aux lipoprotéines de faible et de très faible densité (LDL et VLDL). Ainsi, l'existence de lipo-viro-particules (LVP), contenant à la fois les constituants viraux et les apolipoprotéines B (apoB) et E (apoE) a été suggérée. Ces LVP joueraient un rôle important dans la persistance virale. Cependant, cette association entre HCV et apoB n'a pas été retrouvée *in vitro* avec les modèles cellulaires disponibles.

Mes travaux de thèse se sont donc concentrés sur la mise en place d'un nouveau modèle de culture cellulaire capable de produire à la fois des VLDL et des particules virales HCV, permettant ainsi d'étudier l'interaction entre les deux voies de synthèse. Dans un premier temps, la caractérisation de la production de lipoprotéines par différentes lignées d'hépatocytes a permis de montrer l'existence d'un défaut de sécrétion de VLDL en cellules Huh7.5, classiquement utilisées pour étudier HCV *in vitro*, alors que les cellules HepG2 et HepaRG sont capables de produire des VLDL physiologiques. Dans un second temps, des cellules HepG2 répliquant HCV de manière persistante ont été utilisées pour caractériser les particules virales produites. Etonnamment, à l'instar des cellules Huh7.5 et malgré leur capacité à produire des VLDL, les cellules HepG2 ne sécrèteraient pas de LVP mais des particules virales positives pour apoE et négatives pour apoB.

### **Discipline**

Biologie moléculaire et cellulaire / Virologie

### **Mots-clés**

Virus de l'hépatite C, HCV, hépatocyte, réplication, assemblage, morphogenèse, particules virales, lipoprotéines, VLDL, apolipoprotéine B, apolipoprotéine E, lipo-viro-particules.

**Baptiste Jammart**

***In vitro* study of hepatitis C virus association  
with host lipoproteins.**

**Abstract**

Hepatitis C virus (HCV) mainly infects hepatocytes. It is unique in its ability to impair host lipid metabolism, leading to major liver dysfunctions as, for instance, hepatic steatosis or insulin resistance. *In vivo*, serum virions have a low and variable density, reflecting their association with low- and very-low-density lipoproteins (LDL and VLDL). Hence, the existence of lipo-viro-particles (LVP), containing both viral components as well as apolipoprotein B (apoB) and E (apoE), has been suggested. These LVPs could play an important role in viral persistence. However, this association between HCV and apoB has not been observed *in vitro*, using the currently available cell culture models.

Therefore, during my PhD, I have worked at setting up a new cell culture model, which was capable of producing both VLDL and HCV particles, and therefore would enable the study of the interplay between both synthesis pathways. First of all, we characterized lipoprotein production in different hepatocyte cell lines and confirmed that Huh7.5 cells, usually used to study HCV *in vitro*, were deficient for VLDL secretion, whereas two other cell lines, HepG2 and HepaRG, were able to produce quasi-physiological VLDLs. Therefore, in a second time, we used HepG2 cells to replicate a HCV strain containing a selection gene and to characterize viral particle production. Surprisingly, VLDL-producing HepG2 cells were also unable to secrete LVPs, but rather secreted apoE-positive and apoB-negative viral particles, which were similar to ones Huh7.5 cells produced. This suggests that the ability to produce LVPs does not correlate with the ability to produce VLDL.

**Discipline**

Molecular and cellular biology / Virology

**Keywords**

Hepatitis C virus, HCV, hepatocyte, replication, assembly, morphogenesis, viral particles, lipoproteins, VLDL, apolipoprotein B, apolipoprotein E, lipo-viro-particle.

*Nous ne cherchons jamais les choses, mais la recherche des choses.*

Pascal, Pensée 135.



## Remerciements

Avant tout, je voudrais remercier chacun des membres de mon jury pour leur présence à ma soutenance de thèse. Merci tout particulièrement à Jean Dubuisson et Jean-Christophe Meunier, mes rapporteurs de thèse, pour la relecture critique de mon manuscrit et pour leurs conseils qui, je n'en doute pas, seront fort utiles. Merci à François-Loïc Cosset et à Patrick Maurel qui ont accepté de faire partie de mon jury de thèse en tant qu'examineurs, et merci à Agnès Girard-Egrot de me faire l'honneur de présider ce jury.

Ce doctorat étant la consécration de mes études, je souhaite remercier un certain nombre de personnes pour leur soutien passé, présent et futur. Mon second paragraphe sera ainsi dédié aux membres du corps enseignant qui ont su partager avec ferveur leur amour des sciences de la Vie et de la Terre. Merci donc à Pierre-Yves Viard pour toutes les choses qu'il m'a apprises et pour les bons moments que nous avons passés ensemble. Un grand merci à Vincent Bohly pour son enthousiasme débordant. Merci d'avoir cru en moi et de m'avoir permis d'entrer à l'ENS Lyon. Merci à tous les autres professeurs des classes préparatoires BCPST du Lycée Georges de la Tour, qui se reconnaîtront. Je tiens également à remercier tous les enseignants de la prépa agrég de l'ENS Lyon pour tout ce qu'ils m'ont transmis au cours de cette année hors du commun.

La thèse est une formation longue et complexe. Que serait une formation sans un bon formateur ? Merci David. Merci pour tout ce que tu m'as enseigné, merci pour la confiance que tu m'accordes, merci pour ton soutien, merci pour ton enthousiasme, merci pour ta disponibilité et pour ta sympathie. Et merci surtout d'avoir tenté ta chance avec un homme, ça change pour une fois.

Je ne peux pas remercier David sans remercier les deux autres chercheurs qui ont eu le concours CR1 INSERM section infectiologie en 2005 : Birke Bartosch et Harald Wodrich. En effet, si j'en suis arrivé là, c'est aussi grâce à eux, qui m'ont accueilli et encadré au cours de mes stages de Master1 et Master2. Merci à eux pour leurs connaissances, leurs conseils et leur soutien.

Je tenais à adresser un remerciement tout particulier à Fabien Zoulim qui m'a accueilli dans son laboratoire et qui a toujours su faire preuve d'écoute et de sympathie malgré son emploi du temps surchargé. Merci également à tous les autres membres du laboratoire. En particulier, merci à Romain, pour ses discussions philosophiques, culturelles, et, moins sérieuses, ainsi que pour ses conseils avisés. Merci à Olivier, pour nos échanges informatiques et scientifiques. Merci à Maud pour son aide inestimable, sa bonne humeur, son enthousiasme et pour Impact FM. Merci à Christian, qui était toujours prêt à dépanner d'un réactif, d'un outil ou d'un conseil. Merci à Judith, à Isabelle, à Aurélie et à toutes les autres. Et merci surtout à tous les étudiants et post-doctorants. Pour ne pas les citer, merci à : Christine, qui a égayé mes premières années ; Charlène, parce qu'elle ne serait pas contente que je l'oublie, et parce qu'elle a apporté sympathie, dynamisme et scènes de ménage à mon quotidien laborantin ; Pierre et Clément, partenaires masculins, comprenant, entre autres, mon humour et mon besoin irrésistible de ne pas manger que des sandwiches ; Anaïs, pour son caractère énergique et attachant ; Clémence, pour son dynamisme et ses nombreuses histoires incroyables ; Nathalie, pour sa gentillesse et son écoute ; Marie-Laure, parce qu'elle a eu pitié de moi, quelques fois, en coupant Virage Radio, et pour nos nombreuses discussions ; Maëlen pour son sourire ; Nora ; Thomas ; Dulce ; Marion ; Ghada ; Malika ; Souphalonne ; et tous ceux que j'oublie encore.

J'aimerais également remercier Patrice André, qui a eu la gentillesse de m'accueillir au sein de son équipe pendant le déménagement du laboratoire. Un grand merci également à Patrick Maurel et

à Eve Pecheur, membres de mon comité de suivi de thèse, qui m'ont dispensé des conseils fort utiles en apportant un regard extérieur à mes travaux de thèse. Je remercie tout particulièrement Eve pour son aide expérimentale et pour les moments sympathiques que nous avons passés au microscope électronique. Mes remerciements s'adressent également aux membres des plateformes de microscopie électronique de Lyon, à savoir le CeCILE et le CTμ. Merci à Vladimir Krutovskikh pour son aide concernant la microscopie confocale.

Enfin, je souhaiterais finir ces remerciements par un paragraphe dédié à ma famille et à mes amis. Merci à ma femme, Emmanuelle, qui est toujours là quand j'ai besoin d'elle et qui m'a supporté pendant ces 4 années de thèse. Merci bien évidemment à mes parents et mes beaux-parents, toujours là pour prendre soin de moi et m'aider à faire les bons choix. Et merci à mon frère et mes belles-sœurs, qui m'ont bien aidé à prendre des pauses et du recul. Merci à tous mes amis, dans la recherche où non, qui ont su m'écouter et me conseiller, même si je suis encore loin du prix Nobel. Merci Alexandre, Magali, Fabrice, Benoît, Muriel, Julien, Hélène, Thomas, Audrey, etc.

Merci à tous, du fond du cœur.

# Sommaire

Sommaire .....	11
Liste des figures.....	14
Liste des abréviations.....	16
CHAPITRE I : Données bibliographiques.....	21
1 Introduction : Le virus de l'hépatite C .....	21
1.1 Classification.....	21
1.1.1 Taxinomie .....	21
1.1.2 Génotypes et quasi-espèces virales .....	22
1.2 Epidémiologie.....	22
1.2.1 Prévalence .....	22
1.2.2 Transmission.....	23
1.3 Physiopathologie .....	24
1.3.1 Hépatite C aigüe .....	25
1.3.2 Hépatite C chronique.....	25
1.3.3 Manifestations extra-hépatiques .....	28
1.4 Réponse immunitaire de l'hôte.....	29
1.4.1 Réponse immunitaire innée .....	29
1.4.2 Réponse immunitaire adaptative .....	31
1.4.3 Echappement viral.....	33
1.5 Traitements antiviraux .....	36
1.5.1 Bithérapie interféron / ribavirine .....	36
1.5.2 Marqueurs prédictifs de la réponse au traitement.....	36
1.5.3 Nouvelles molécules antivirales .....	37
1.5.4 Stratégies vaccinales .....	39
2 Biologie moléculaire du virus de l'hépatite C.....	39
2.1 Structure et organisation du génome .....	39
2.1.1 Structure et variabilité du génome .....	39
2.1.2 Les régions non codantes .....	39
2.1.3 Les régions codantes .....	41
2.2 Biologie cellulaire de la réplication virale.....	47
2.2.1 Entrée virale .....	48
2.2.2 Expression et maturation des protéines virales .....	52
2.2.3 Réplication du génome viral.....	54
3 Le foie, organe cible du virus de l'hépatite C .....	56
3.1 Organisation du foie.....	57
3.1.1 Populations cellulaires.....	57

3.1.2	Organisation spatiale.....	58
3.1.3	Polarisation des hépatocytes .....	59
3.2	Physiologie hépatique .....	61
3.2.1	Détoxification .....	61
3.2.2	Sécrétion des acides biliaires.....	63
3.2.3	Métabolisme glucidique .....	63
3.2.4	Métabolisme lipidique.....	65
3.3	Altérations hépatiques viro-induites.....	71
3.3.1	Stress oxydant, mitochondrie et réticulum endoplasmique .....	71
3.3.2	Stress du réticulum endoplasmique et autophagie .....	72
3.3.3	Métabolisme lipidique et stéatose.....	75
3.3.4	Fibrose et carcinome hépatocellulaire .....	76
4	Structure et composition des particules virales .....	77
4.1	Hétérogénéité de la population virale <i>in vivo</i> .....	77
4.2	Association entre HCV et les lipoprotéines <i>in vivo</i> .....	78
4.3	Structure et composition du HCV <i>in vitro</i> .....	80
4.4	Assemblage et sécrétion des particules virales.....	83
4.4.1	Assemblage de la nucléocapside .....	83
4.4.2	Implication des gouttelettes lipidiques .....	84
4.4.3	Rôle du couple p7/NS2 .....	85
4.4.4	Rôle des autres protéines non structurales .....	86
4.4.5	Assemblage viral et lipoprotéines .....	86
4.4.6	Divers acteurs cellulaires impliqués dans la morphogenèse.....	87
4.4.7	Trafic et sécrétion des nouveaux virions.....	87
5	Importance des modèles d'étude.....	89
5.1	Modèles d'étude <i>in vivo</i> .....	89
5.1.1	Homme .....	89
5.1.2	Primates.....	89
5.1.3	Souris .....	90
5.2	Modèles d'étude <i>in vitro</i> .....	92
5.2.1	Etude des altérations cellulaires viro-induites .....	92
5.2.2	Etude de la morphogenèse virale.....	97
CHAPITRE II :	Objectifs des travaux de recherche.....	99
CHAPITRE III :	Impact de la différenciation des hépatocytes humains sur l'assemblage et la sécrétion des lipoprotéines de très faible densité.....	101
1	Introduction.....	101
2	Approche expérimentale.....	101
3	Article en cours de publication.....	102

4	Conclusion .....	123
CHAPITRE IV : Réplication d'un virus HCV tagué à la blasticidine dans des cellules HepG2 et caractérisation des particules virales sécrétées .....		
1	Introduction.....	125
2	Approche expérimentale.....	125
3	Article en cours de publication.....	126
4	Complément : Modifications de la polarisation cellulaire .....	159
4.1	Introduction.....	159
4.2	Protocole expérimental.....	159
4.3	Résultats .....	160
5	Conclusion .....	161
CHAPITRE V : Discussion & perspectives .....		
1	Sécrétion de lipoprotéines en culture cellulaire .....	163
2	Analyses de l'ultrastructure subcellulaire .....	164
3	Influence du virus sur la polarisation et la physiologie cellulaires .....	166
4	Interactions avec les facteurs de croissance .....	168
5	Structure et composition des particules virales <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> .....	169
6	Importance des conditions de culture cellulaire.....	170
7	Modèles cellulaires alternatifs de réplication du HCV .....	172
8	Influence de la réplication virale sur le métabolisme des lipoprotéines .....	172
9	Conclusion .....	173
Références bibliographiques.....		175

## Liste des figures

Figure 1. Classification du virus de l'hépatite C : Arbres phylogénétiques. ....	21
Figure 2. Carte mondiale de la prévalence à l'infection par HCV.....	23
Figure 3. Carte mondiale de la répartition des géotypes HCV.....	23
Figure 4. Histoire naturelle de l'infection par HCV.....	24
Figure 5. Pathophysiologie de la stéatose hépatique. ....	26
Figure 6. Pathogenèse de la fibrose induite par HCV.....	27
Figure 7. Réponse immunitaire innée intracellulaire à HCV. ....	30
Figure 8. Les acteurs clef de la réponse immunitaire hépatique. ....	32
Figure 9. Stratégies virales d'échappement à la réponse immunitaire.....	35
Figure 10. Etapes virales ciblées pour le développement de nouveaux antiviraux. ....	38
Figure 11. Structures secondaires de l'ARN génomique du HCV. ....	40
Figure 12. Organisation du génome, synthèse, maturation et structure des protéines virales. ....	42
Figure 13. Domaines structuraux et fonctions de quelques protéines virales.....	45
Figure 14. Cycle viral du virus de l'hépatite C (HCV). ....	48
Figure 15. Entrée du HCV dans la cellule hôte. ....	50
Figure 16. Influence du métabolisme lipidique et du cholestérol sur l'entrée du HCV. ....	52
Figure 17. Traduction cap-indépendante du génome viral.....	53
Figure 18. Réplication du génome viral et facteurs de l'hôte associés. ....	55
Figure 19. Organisation spatiale d'un acinus hépatique. ....	58
Figure 20. Polarisation des hépatocytes. ....	60
Figure 21. Cycle hépatique des acides biliaires et clairance hépatique.....	62
Figure 22. Régulation du métabolisme du glucose dans le foie.....	64
Figure 23. Résistance à l'insuline induite par les protéines virales. ....	65
Figure 24. Cycle plasmatique des lipoprotéines.....	67
Figure 25. Voies métaboliques permettant la synthèse de triglycérides dans le foie. ....	69
Figure 26. Morphogenèse hépatique des VLDL. ....	71
Figure 27. Déroulement de la réponse aux protéines mal conformées (UPR). ....	73
Figure 28. Implications du stress du RE et de l'autophagie dans l'immunité antivirale. ....	74
Figure 29. Structure et composition des particules virales observées <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> . ....	80
Figure 30. Rôle des gouttelettes lipidiques dans l'assemblage du HCV.....	84
Figure 31. Morphogenèse hypothétique du HCV.....	88
Figure 32. Les différents modèles murins utilisés pour étudier HCV.....	91

Figure 33. Le système de réplicon HCV et son utilisation. ....	93
Figure 34. Le système réplcatif HCVcc et son utilisation.....	94
Figure 35. Altérations ultrastructurales induites par HCV. ....	96
Figure 36. Sécrétion de VLDL par deux lignées d'hépatome HepG2 et Huh7. ....	98
Figure 37. Une réplication virale persistante modifie la polarisation cellulaire. ....	160

## Liste des abréviations

	<b>English signification</b>	<b>Signification française</b>
<b>5BSL</b>	Stem-loop structure in NS5B coding sequence	Tige-boucle dans la séquence codante de NS5B
<b>ABCA</b>	ATP-binding cassette transporter, subfamily A	Transporteur à cassette liant l'ATP, famille A
<b>ABCG</b>	ATP-binding cassette transporter, subfamily G	Transporteur à cassette liant l'ATP, famille G
<b>ACAT</b>	Acetyl-CoA acyltransferase	Acétyl-CoA acyltransférase
<b>ACC</b>	Acetyl-CoA carboxylase	Acétyl-CoA carboxylase
<b>ADN</b>	Deoxyribonucleic acid	Acide désoxyribonucléique
<b>ADRP</b>	Adipose-differentiation related protein	Protéine reliée à la différenciation adipeuse
<b>Alb</b>	Albumin	Albumine
<b>ALT</b>	Alanine transaminases	Alanine transaminases
<b>AP1</b>	Activator protein 1	Protéine activatrice 1
<b>apo</b>	Apolipoprotein	Apolipoprotéine
<b>ARFP</b>	Alternative reading frame protein	Protéine de cadre de lecture alternatif
<b>ARN</b>	Ribonucleic acid	Acide ribonucléique
<b>ATF4/6</b>	Activating transcription factor 4/6	Facteur de transcription activateur 4/6
<b>BHK-21</b>	Baby hamster kidney 21	Cellules 21 de rein de hamster juvénile
<b>BSD</b>	Blasticidin S deaminase	Blasticidine S désaminase
<b>BSEP</b>	Bile salts export pump	Pompe d'export des sels biliaires
<b>BVDV</b>	Bovine viral diarrhea virus	Virus de la diarrhée virale bovine
<b>c/EBP</b>	CCAAT/enhancer binding protein	Protéine de liaison aux enhanceurs CCAAT
<b>CBP</b>	Carbohydrate binding protein	Protéine de liaison aux sucres
<b>CDCA</b>	Chenodeoxycholic acid	Acide chénodésoxycholique
<b>CE</b>	Cholesteryl ester	Ester de cholestérol
<b>CERT</b>	Ceramide transfer protein	Protéine de transfert de céramide
<b>CETP</b>	Cholesteryl ester transfer protein	Protéine de transfert d'esters de cholestérol
<b>CHC</b>	Chronic hepatitis C	Hépatite C chronique
<b>CHOP</b>	c/EBP homologous protein	Protéine homologue à c/EBP
<b>ChREBP</b>	Carbohydrate response element binding protein	Protéine de liaison aux éléments de réponse aux glucides
<b>CLDN-1</b>	Claudin 1	Claudine 1
<b>CMH</b>	Major histocompatibility complex	Complexe majeur d'histocompatibilité
<b>CRE</b>	Cis-regulating element	Élément cis-régulateur
<b>CsA</b>	Cyclosporin A	Cyclosporine A
<b>CTL</b>	Cytotoxic T lymphocyte	Lymphocyte T cytotoxique
<b>CVB</b>	Coxsackievirus B	Virus Coxsackie B
<b>CYP</b>	Cytochrome P450 family	Famille du cytochrome P450
<b>CypA/B</b>	Cyclophilin A/B	Cyclophiline A/B
<b>DAA</b>	Direct-acting antivirals	Antiviraux à action directe
<b>DAG</b>	Diacylglycerol	Diacylglycérol
<b>DC</b>	Dendritic cell	Cellule dendritique
<b>DC-SIGN</b>	DC-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin	Molécule d'adhésion intercellulaire non intégrine et DC-spécifique
<b>DF</b>	Dual frameshift	Déplacement double de cadre
<b>DGAT</b>	Diglyceride acyltransferase	Diglycéride acyltransférase

<b>DMV</b>	Double-membrane vesicle	Vésicule à double membrane
<b>ECMV</b>	Encephalomyocarditis virus	Virus de l'encéphalomyocardite
<b>EGF</b>	Epidermal growth factor	Facteur de croissance épidermique
<b>EGFR</b>	EGF receptor	Récepteur à l'EGF
<b>eIF2/3</b>	Eukaryote initiation factor 2/3	Facteur d'initiation eucaryote
<b>ERAD</b>	ER-associated degradation	Dégradation associée au RE
<b>ERK</b>	Extracellular signal-regulated kinase	Kinase régulée par les signaux extracellulaires
<b>ESCRT</b>	Endosomal sorting complex required for transport	Complexe endosomal de tri requis pour le transport
<b>F</b>	Frameshift	Déplacement de cadre
<b>FAK</b>	Focal adhesion kinase	Kinase des adhésions focales
<b>FAS</b>	Fatty acid synthase	Acide gras synthase
<b>FBL-2</b>	F-box leucin-rich protein 2	Protéine 2 à F-box et riche en leucines
<b>FKBP8</b>	FK506 binding protein 8	Protéine 8 de liaison à FK506
<b>FLR</b>	Full-length replicon	Réplicon complet
<b>FoxO</b>	Forkhead family transcription factor O	Facteur de transcription O de la famille forkhead
<b>FXR</b>	Farnesoid X receptor	Récepteur du farnésioïde X
<b>GADD34</b>	Growth arrest and DNA damage	Arrêt de croissance et dommages à l'ADN
<b>GAG</b>	Glycosaminoglycan	Glycosaminoglycane
<b>GFP</b>	Green fluorescent protein	Protéine fluorescente verte
<b>GK</b>	Glucokinase	Glucokinase
<b>H<math>\alpha</math></b>	$\alpha$ -helix	Hélice $\alpha$
<b>HAV</b>	Hepatitis A virus	Virus de l'hépatite A
<b>HBV</b>	Hepatitis B virus	Virus de l'hépatite B
<b>HCC</b>	Hepatocellular carcinoma	Carcinome hépatocellulaire
<b>HCV</b>	Hepatitis C virus	Virus de l'hépatite C
<b>HCVcc</b>	HCV cell-culture	HCV produit en culture cellulaire
<b>HCVpp</b>	HCV pseudo-particles	Pseudo-particules HCV
<b>HDL</b>	High-density lipoprotein	Lipoprotéine de forte densité
<b>HIV</b>	Human immunodeficiency virus	Virus de l'immunodéficience humaine
<b>HL</b>	Hepatic lipase	Lipase hépatique
<b>HNE</b>	4-hydroxynonenol	4-hydroxynonenol
<b>HNF-4</b>	Hepatic nuclear factor 4	Facteur nucléaire hépatique 4
<b>HSC70</b>	Heat shock cognate 70 kDa protein	Protéine apparentée à Hsp70
<b>HSL</b>	Hormone-sensitive lipase	Lipase sensible aux hormones
<b>Hsp72/90</b>	Heat shock protein 72/90 kDa	Protéine de choc thermique de 72/90 kDa
<b>HSPG</b>	Heparan sulfate proteoglycan	Protéoglycane d'héparane sulfate
<b>HVR</b>	Hypervariable region	Région hypervariable
<b>IDL</b>	Intermediate-density lipoprotein	Lipoprotéine de densité intermédiaire
<b>IFN</b>	Interferon	Interféron
<b>IGF2BP1</b>	IGF2-mRNA binding protein 1	Protéine de liaison 1 à l'ARN messager de l'IGF2
<b>IgG/M</b>	Immunoglobulin G/M	Immunoglobuline G/M
<b>IL</b>	Interleukin	Interleukine
<b>IP-10</b>	IFN- $\gamma$ -inducible protein 10	Protéine 10 inductible par l'IFN- $\gamma$
<b>IPS-1</b>	IFN- $\beta$ promoter stimulator 1	Stimulateur 1 du promoteur de l'IFN- $\beta$
<b>IRE1</b>	Inositol requiring enzyme	Enzyme nécessitant l'inositol

<b>IRES</b>	Internal ribosome entry site	Site d'entrée interne du ribosome
<b>IRF</b>	Interferon regulatory factor	Facteur de régulation de l'interféron
<b>IRS-1</b>	Insulin receptor substrate 1	Substrat 1 du récepteur à l'insuline
<b>ISG</b>	Interferon-stimulated gene	Gène stimulé par l'interféron
<b>ISGF3</b>	IFN-stimulated gene factor 3	Facteur 3 des gènes stimulés par l'IFN
<b>ISRE</b>	IFN-stimulated response element	Élément de réponse stimulé par l'IFN
<b>JAK</b>	Janus kinase	Kinase Janus
<b>JFH1</b>	Japanese fulminant hepatitis 1	Hépatite japonaise fulminante 1
<b>L-PK</b>	Liver-pyruvate kinase	Pyruvate kinase du foie
<b>LC3</b>	Microtubule-associated protein 1 light chain 3	Chaîne légère 3 de la protéine 1 associée aux microtubules
<b>LCAT</b>	Lecithin-cholesterol acyltransferase	Lécithine-cholestérol acyltransférase
<b>LCFA</b>	Long-chain fatty acid	Acide gras à chaîne longue
<b>LD</b>	Lipid droplet	Gouttelette lipidique
<b>LDL</b>	Low-density lipoprotein	Lipoprotéine de faible densité
<b>LDLR</b>	LDL receptor	Récepteur aux LDL
<b>LNA</b>	Locked nucleic acid	Acide nucléique verrouillé
<b>LPL</b>	Lipoprotein lipase	Lipoprotéine lipase
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharide	Lipopolysaccharide
<b>LRP1</b>	LDLR-related protein 1	Protéine 1 apparenté au LDLR
<b>LSEC</b>	Liver sinusoidal endothelial cells	Cellules endothéliales sinusoides du foie
<b>LuLD</b>	Luminal lipid droplet	Gouttelette lipidique luminale
<b>LVP</b>	Lipo-viro-particles	Lipo-viro-particules
<b>MDA</b>	Malondialdehyde	Malondialdéhyde
<b>MDA-5</b>	Melanoma differentiation-associated protein 5	Protéine 5 associée à la différenciation des mélanomes
<b>mDC</b>	Myeloid DC	Cellule dendritique myéloïde
<b>MDR</b>	Multi-drug resistance protein	Prot. de résistance multiple aux médicaments
<b>MEK</b>	Mitogen-activated protein kinase kinase	Protéine kinase kinase activée par les mitogènes
<b>microRNA</b>	microRNA	micro-ARN
<b>miR-122</b>	microRNA 122	micro-ARN 122
<b>MMV</b>	Multi-membrane vesicle	Vésicule à membranes multiples
<b>MRP</b>	Multi-drug resistance-associated protein	Protéine associée à une résistance multiple aux médicaments
<b>mTOR</b>	Mammalian target of rapamycin	Cible mammifère de la rapamycine
<b>MTP</b>	Microsomal triglyceride transfer protein	Prot. microsomale de transfert de triglycérides
<b>MVB</b>	Multi-vesicular body	Corps multi-vésiculaire
<b>MW</b>	Membranous web	Réseau membranaire
<b>MyD88</b>	Myeloid differentiation factor 88	Facteur de différenciation myéloïde 88
<b>NCR</b>	Non-coding region	Région non codante
<b>NES</b>	Nuclear export signal	Signal d'export nucléaire
<b>NF-κB</b>	Nuclear factor κB	Facteur nucléaire κB
<b>NK</b>	Natural Killer cells	Cellules tueuses naturelles
<b>NKG2D</b>	Natural killer group 2, member D	Natural killer groupe 2, membre D
<b>NKT</b>	Natural Killer T cells	Cellules T tueuses naturelles
<b>NLR</b>	Nodd-like receptor	Récepteur de type Nodd
<b>NLS</b>	Nuclear localization signal	Signal de localisation nucléaire

<b>NPC1L1</b>	Niemann-Pick C1-Like 1	Molécule de type Niemann-Pick C1
<b>NS</b>	Non-structural	Non structurale
<b>NTCP</b>	Na <sup>+</sup> -taurocholate cotransporter polypeptide	Polypeptide co-transporteur de Na <sup>+</sup> et de taurocholate
<b>NTPase</b>	Nucleotide-triphosphate hydrolase	Nucléotide-triphosphate hydrolase
<b>OAT</b>	Organic anion transporter	Transporteur d'anions organiques
<b>OCN</b>	Occludin	Occludine
<b>OCT</b>	Organic cation transporter	Transporteur de cations organiques
<b>OMS</b>	World Health Organisation	Organisation Mondiale de la Santé
<b>ORF</b>	Open-reading frame	Cadre de lecture ouvert
<b>OSBP</b>	Oxysterol binding protein	Protéine de liaison à l'oxystérol
<b>PAMP</b>	Pathogen-associated molecular pattern	Motif moléculaire associé aux pathogènes
<b>PBMC</b>	Peripheral blood mononuclear cells	Cellules mononuclées du sang périphérique
<b>PD-1</b>	Programmed cell death 1	Mort cellulaire programmée 1
<b>pDC</b>	Plasmacytoid DC	Cellule dendritique plasmacytoïde
<b>PE</b>	Phosphatidylethanolamine	Phosphatidyléthanolamine
<b>pegIFN</b>	Pegylated interferon	Interféron pégylé
<b>PERK</b>	PKR-like endoplasmic reticulum kinase	Kinase du réticulum endo. similaire à PKR
<b>PHH</b>	Primary human hepatocytes	Hépatocytes primaires humains
<b>PI3K</b>	Phosphatidylinositol-3 kinase	Phosphatidylinositol-3 kinase
<b>PI4K-III<math>\alpha</math></b>	Phosphatidylinositol-4 kinase III $\alpha$	Phosphatidylinositol-4 kinase III $\alpha$
<b>PI4P</b>	Phosphatidylinositol-4-phosphate	Phosphatidylinositol-4-phosphate
<b>PKB</b>	Protein kinase B	Protéine kinase B
<b>PKD</b>	Protein kinase D	Protéine kinase D
<b>PKR</b>	Protein kinase RNA-dependent	Protéine kinase dépendant de l'ARN
<b>PL</b>	Phospholipid	Phospholipide
<b>PLTP</b>	Phospholipid transfer protein	Protéine de transfert de phospholipides
<b>PP2A</b>	Protein phosphatase 2 A	Protéine phosphatase 2 A
<b>PPAR<math>\alpha</math></b>	Peroxisome proliferators activated receptor $\alpha$	Récepteur $\alpha$ activé par les proliférateurs de peroxyosomes
<b>PRD</b>	Positive regulator domain	Domaine de régulation positive
<b>PRR</b>	Pathogen recognition receptor	Récepteur de reconnaissance des pathogènes
<b>PTB</b>	Polypyrimidin-tract binding protein	Prot. de liaison aux séquences poly-pyrimidiques
<b>PTEN</b>	Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10	Homologue de phosphatase et de tensine supprimée du chromosome 10
<b>RdRp</b>	RNA-dependent RNA-polymerase	ARN-polymérase ARN-dépendante
<b>RE</b>	Endoplasmic reticulum	Réticulum endoplasmique
<b>RIG-I</b>	Retinoic-acid-inducible gene	Gène inductible à l'acide rétinoïque
<b>RLR</b>	RIG-like receptor	Récepteur de type RIG
<b>RNAi</b>	RNA interference	Interférence à ARN
<b>ROS</b>	Reactive oxygen species	Espèces réactives de l'oxygène
<b>RTK</b>	Receptor tyrosine kinase	Récepteur tyrosine kinase
<b>RVR</b>	Rapid virological response	Réponse virologique rapide
<b>RXR<math>\alpha</math></b>	Retinoid X Receptor $\alpha$	Récepteur $\alpha$ au rétinoïde X
<b>SAC</b>	Sub-apical compartment	Compartiment subapical
<b>SARS</b>	Severe acute respiratory syndrome	Syndrome respiratoire aigu sévère
<b>SCID</b>	Severe combined immunodeficiency	Immunodéficiences sévères combinées

<b>SFV</b>	Semliki forest virus	Virus de la forêt Semliki
<b>SGR</b>	Subgenomic replicon	Réplicon sous-génomique
<b>SOCS</b>	Suppressor of cytokine signaling	Suppresseur de signal cytokinique
<b>SPP</b>	Signal peptide peptidase	Signal peptide peptidase
<b>SR-BI</b>	Scavenger receptor class B, type I	Récepteur scavenger classe B, type I
<b>SREBP-1</b>	Sterol regulating element-binding protein 1	Protéine 1 de liaison aux éléments régulateurs des stérols
<b>STAT</b>	Signal transducer and activator of transcription	Transducteur du signal et activateur de la transcription
<b>SVR</b>	Sustained virological response	Réponse virologique soutenue
<b>TCR</b>	T cell receptor	Récepteur des cellules T
<b>TG</b>	Triacylglycerol / Triglyceride	Triacylglycérol / Triglycéride
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Tumor growth factor $\beta$	Facteur $\beta$ de croissance tumorale
<b>TGH</b>	Triacylglycerol hydrolase	Triacylglycérol hydrolase
<b>TGN</b>	Trans-golgi network	Réseau trans-golgien
<b>TIP47</b>	Tail-interacting protein of 47 kDa	Protéine de 47 kDa interagissant avec la queue
<b>TLR</b>	Toll-like receptor	Récepteur de type Toll
<b>TMD</b>	Transmembrane domain	Domaine transmembranaire
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tumor necrosis factor $\alpha$	Facteur $\alpha$ de nécrose tumorale
<b>TRIF</b>	TIR-domain-containing adaptor inducing IFN- $\beta$	Adaptateur à domaine TIR induisant IFN- $\beta$
<b>uPA</b>	Urokinase plasminogen activator	Urokinase activateur de plasminogène
<b>UPR</b>	Unfolded protein response	Réponse aux protéines mal conformées
<b>VAMP1</b>	Vesicle-associated membrane protein 1	Protéine 1 membranaire associée aux vésicules
<b>VAP</b>	VAMP associated protein	Protéine d'association à VAMP
<b>VEGF</b>	Vascular endothelial growth factor	Fact. de croissance de l'endothélium vasculaire
<b>VEGFR</b>	VEGF receptor	Récepteur de VEGF
<b>VLDL</b>	Very-low-density lipoprotein	Lipoprotéine de très faible densité
<b>VLP</b>	Virus-like particles	Pseudo-virions
<b>VRE</b>	Virus response element	Élément de réponse aux virus
<b>WHO</b>	World Health Organization	Organisation Mondiale de la Santé
<b>WNV</b>	West-Nile virus	Virus du Nil ouest
<b>XBP1</b>	X-box binding protein 1	Protéine 1 de liaison aux X-box
<b>YB-1</b>	Y-box binding protein 1	Protéine 1 de liaison aux boîtes Y
<b>YFV</b>	Yellow fever virus	Virus de la fièvre jaune

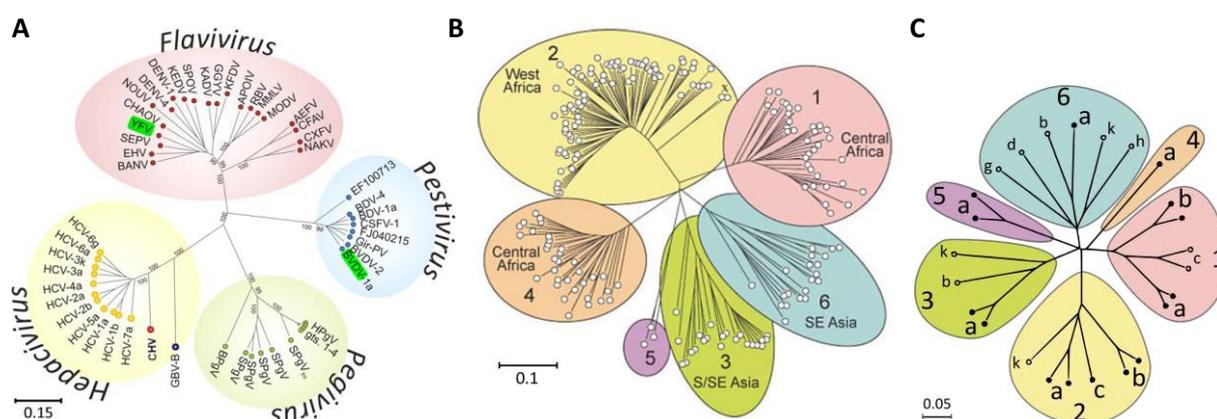
# CHAPITRE I : Données bibliographiques

## 1 Introduction : Le virus de l'hépatite C

### 1.1 Classification

#### 1.1.1 Taxinomie

Tout d'abord connu sous la dénomination d'hépatite non A non B, le virus de l'hépatite C (HCV) n'a été isolé et cloné qu'en 1989 (Choo et al., 1989). Il s'agit d'un virus enveloppé à ARN simple brin monocaténaire de polarité positive. Le génome du HCV est très différent de celui des virus de l'hépatite A (HAV) ou de l'hépatite B (HBV) mais partage des homologies avec des membres de la famille des *Flaviviridae*, qui inclut les *Flavivirus* (virus de la fièvre jaune, virus du Nil occidental, virus de la dengue) et les *Pestivirus* (virus de la diarrhée virale bovine). Cependant, HCV reste un virus à part, classé en tant que représentant majoritaire de son genre (*Hépacivirus*) au sein de la famille des *Flaviviridae* (Figure 1). HCV a pour hôte naturel exclusif l'Homme (*Homo sapiens*). Toutefois, le chimpanzé (*Pan troglodytes*), également susceptible à l'infection, peut être inoculé expérimentalement avec HCV et développe une hépatite qui s'apparente à celle observée chez l'Homme.



**Figure 1.** Classification du virus de l'hépatite C : Arbres phylogénétiques.

(A) Analyse phylogénétique d'une région conservée du gène de la polymérase à ARN des membres représentatifs des genres Hépacivirus, Pégivirus, Pestivirus et Flavivirus. L'alignement des séquences en acides aminés a été réalisé avec le programme ClustalW. L'arbre a été construit par la méthode de Neighbor Joining. La barre d'échelle est une mesure de la distance des séquences en acides aminés. HCV = Virus de l'hépatite C ; YFV = Virus de la fièvre jaune ; BVDV = Virus de la diarrhée virale bovine. (Extrait de Kapoor et al., 2011)

(B) Analyse phylogénétique des toutes les séquences nucléotidiques codant pour la protéine NS5B de HCV. L'arbre a été construit par la méthode de Neighbor Joining. La barre d'échelle est une mesure de la distance des séquences nucléotidiques. La localisation géographique de variants d'Afrique sub-saharienne ou d'Asie du sud-est est notée. (Extrait de Simmonds et al., 2005)

(C) Analyse phylogénétique de la séquence codante complète de génome HCV pour chaque génotype et sous-type. L'arbre a été construit par la méthode de Neighbor Joining. La barre d'échelle est une mesure de la distance des séquences nucléotidiques. (Adapté de Simmonds et al., 2005)

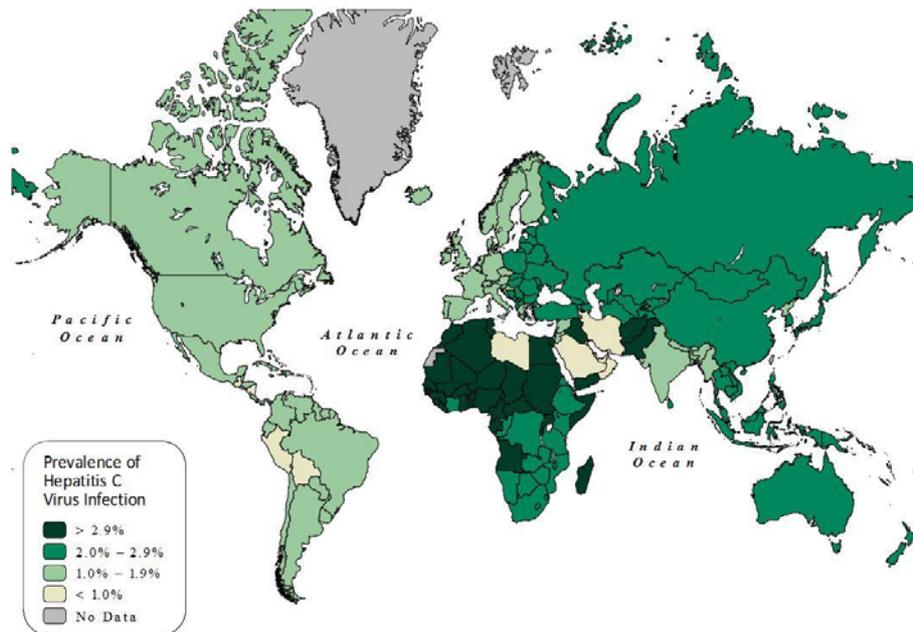
### **1.1.2 Génotypes et quasi-espèces virales**

Le génome du HCV présente une forte variabilité. En effet, l'ARN polymérase virale responsable de la réplication du génome ne possède pas d'activité relecture/correction efficace et favorise ainsi l'apparition de mutations et l'émergence de quasi-espèces virales voire de génotypes distincts (Martell et al., 1992; Le Guillou-Guillemette et al., 2007). La notion de quasi-espèce virale permet de définir la forte variabilité du virus chez un patient donné. En effet, le fort taux de mutation du génome viral ( $1,4 \cdot 10^3$  à  $1,9 \cdot 10^3$  substitution par nucléotide et par an) permet à un inoculum initial homogène de diverger au cours de l'infection du patient, donnant ainsi naissance à une population virale hétérogène, la quasi-espèce virale (Murakawa et al., 1992). La notion de génotype pour HCV repose sur le séquençage des régions codantes et variables du génome, à savoir la région codant pour les protéines structurales core et E1 (Choo et al., 1991; Bukh et al., 1993), et celle codant pour la protéine non structurale NS5 (Simmonds et al., 1994) (cf. §2.1.3 pour la description de ces protéines virales). La classification et la nomenclature utilisées actuellement ont été proposées comme consensus des différents génotypes existants, sur la base de regroupements phylogénétiques d'après la séquence de NS5B (Robertson et al., 1998; Simmonds et al., 2005). On distingue finalement 6 génotypes différents numérotés de 1 à 6, comportant chacun plusieurs sous-types (notés 1a, 1b, 2a, 2b, etc.) (Figure 1). Comme nous le verrons plus tard, l'identification de ces génotypes est importante en clinique, étant donné qu'ils sont associés à une sensibilité variable aux traitements antiviraux (Hnatyszyn, 2005).

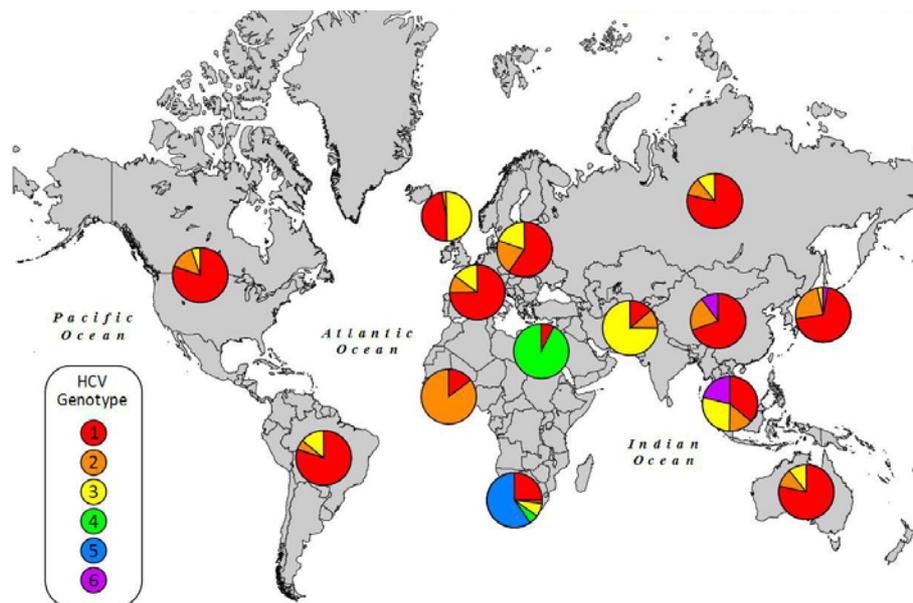
## **1.2 Epidémiologie**

### **1.2.1 Prévalence**

HCV est une des principales causes d'infection chronique chez l'Homme. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a en effet estimé que près de 3% de la population mondiale a été infectée par ce virus, soit entre 130 et 170 millions d'individus (Rapport OMS, 1999; Shepard et al., 2005). Il est estimé que 3 à 4 millions de personnes supplémentaires sont infectées chaque année. Finalement, environ 350 000 personnes meurent chaque année de maladies hépatiques associées au HCV dans le monde. La prévalence de l'infection HCV, estimée par la présence d'anticorps anti-HCV, varie sensiblement selon les continents, les pays et les populations dans lesquelles elle est mesurée (Memon and Memon, 2002). Globalement, elle varie de 0,01% à 5,6% chez les populations de donneurs volontaires de sang, de 0% à 16,9% dans la population générale (Alter, 2007). Les principaux foyers d'infection sont localisés en Afrique et en Asie, où la prévalence peut atteindre 10 à 20% comme en Egypte. En Amérique du Nord ou en Europe Occidentale, la prévalence est généralement proche de 1% (Memon and Memon, 2002) (Figure 2). De plus, les différents génotypes viraux présentent des distributions géographiques très diverses. En effet, les génotypes 1, 2 et 3 sont retrouvés très fréquemment aux Etats-Unis et en Europe, alors que le génotype 4 est majoritairement présent en Egypte et en Afrique du Nord, le génotype 5 en Afrique du Sud et le génotype 6 en Asie orientale (Figure 3). Un bilan concernant l'Europe a été récemment publié (Esteban et al., 2008). Cette répartition des génotypes viraux a des conséquences directes sur les populations infectées étant donnée la variabilité des réponses aux traitements des différents génotypes (Feld and Hoofnagle, 2005; Hnatyszyn, 2005) (cf. §1.5.1). Malheureusement, la plupart des recherches actuelles se concentrent sur les génotypes 1 et 2, et dans une moindre mesure sur le génotype 3.



**Figure 2.** Carte mondiale de la prévalence à l'infection par HCV.  
Adapté de Shepard et al., 2005, basé sur des données de l'OMS (1999).



**Figure 3.** Carte mondiale de la répartition des génotypes HCV.  
A partir de données de l'OMS (2009)

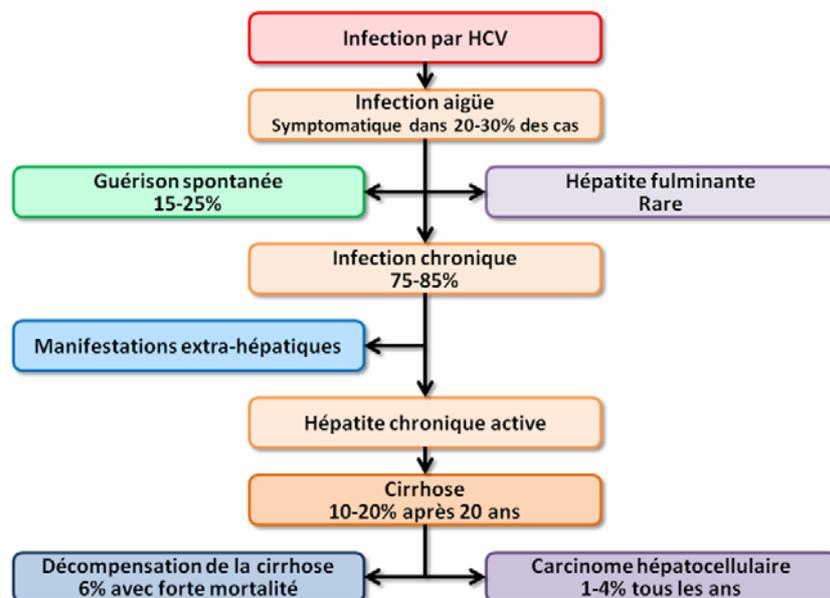
### 1.2.2 Transmission

Avant la découverte du virus et la mise en place d'un contrôle systématique de l'absence d'anticorps dirigés contre HCV dans les échantillons sanguins à partir de 1992, la transfusion sanguine a été le mode majoritaire de transmission du HCV. Jusqu'à la fin des années 80, le risque d'infection par transfusion pouvait atteindre 10% dans certains pays (Alter, 2007). Actuellement, dans les pays développés, la principale cause de transmission du virus est liée à l'usage de seringues contaminées par les toxicomanes (Martin et al., 2012). En Europe, la prévalence du HCV chez les toxicomanes varie de 30% à 98% selon le pays et le mode d'administration de la drogue (Roy et al.,

2002). La transmission du virus au sein des populations carcérales représente ainsi un réel problème aux Etats-Unis, et probablement ailleurs. Les autres modes de transmission du HCV sont : les accidents d'exposition au sang avec des aiguilles contaminées pour les professionnels de la santé ; la transmission périnatale avec un risque de 5 à 10% ; la transmission sexuelle avec un risque inférieur à 4% (8% pour les homosexuels à partenaires multiples) ; l'administration intra-nasale de cocaïne avec usage d'équipements partagé ; et la pratique de scarifications et autres tatouages dans des conditions d'hygiène inadéquates (Alter, 1997; Zarski and Leroy, 1999). Les transmissions d'origine nosocomiale existent, mais sont difficilement quantifiables. Elles relèvent essentiellement d'une mauvaise désinfection et/ou stérilisation du matériel médical (Esteban et al., 2008). Aujourd'hui, la mise en place d'un test systématique des échantillons sanguins, de procédures strictes de désinfection du matériel médical et l'utilisation de matériel à usage unique ont permis de réduire significativement le risque de transmission du virus dans les pays industrialisés. Néanmoins, l'infection par HCV conduisant fréquemment au développement d'une hépatite chronique comme nous allons le voir ci-après, le nombre de pathologies associées au HCV ne cesse de croître avec l'âge des patients infectés dans les années 80, posant un problème majeur de santé publique.

### 1.3 Physiopathologie

Au cours des premières semaines de l'infection par HCV, les patients développent une hépatite C aiguë qui évolue dans la plupart des cas en hépatite chronique pouvant rester asymptomatique de nombreuses années. A long terme, cette hépatite chronique peut entraîner le développement d'une cirrhose, qui pourra ensuite évoluer vers une décompensation et/ou un carcinome hépatocellulaire (HCC) (Figure 4). Nous allons détailler dans les paragraphes qui suivent l'évolution de la maladie.



**Figure 4.** Histoire naturelle de l'infection par HCV.

(Adapté de Di Bisceglie, 2000; Chen and Morgan, 2006)

### **1.3.1 Hépatite C aigüe**

L'hépatite aigüe qui accompagne l'infection virale entraîne chez certains patients une forte augmentation des alanine transaminases (ALT) dans le sérum sans qu'il n'y ait pour autant de corrélation avec la charge virale ou la sévérité de l'hépatite. Elle reste cependant asymptomatique dans la plupart des cas, avec seulement 20 à 30% des patients présentant des symptômes modérés tels que fatigue, nausées, appétit réduit, douleurs abdominales ou jaunisse. L'apparition d'anticorps anti-HCV dans le sérum des patients (séroconversion) se fait 1 à 3 mois après exposition (Chen and Morgan, 2006). Ces derniers sont majoritairement et dans un premier temps des anticorps dirigés contre la protéine virale de capsid (HCV core) chez plus de 94% des patients (Hino et al., 1994). Dans 15 à 25% des cas d'infection, l'hépatite aigüe arrive à son terme en 6 à 8 semaines, les ALT reviennent à la normale et l'ARN viral devient indétectable, signe d'une guérison spontanée du patient. Cependant, dans la majorité des cas, le virus échappe au système immunitaire, l'hépatite se maintient et devient chronique (Figure 4). Les cas d'hépatite fulminante sont très rares (moins de 1%), mais sont généralement fatals pour près de 85% des patients.

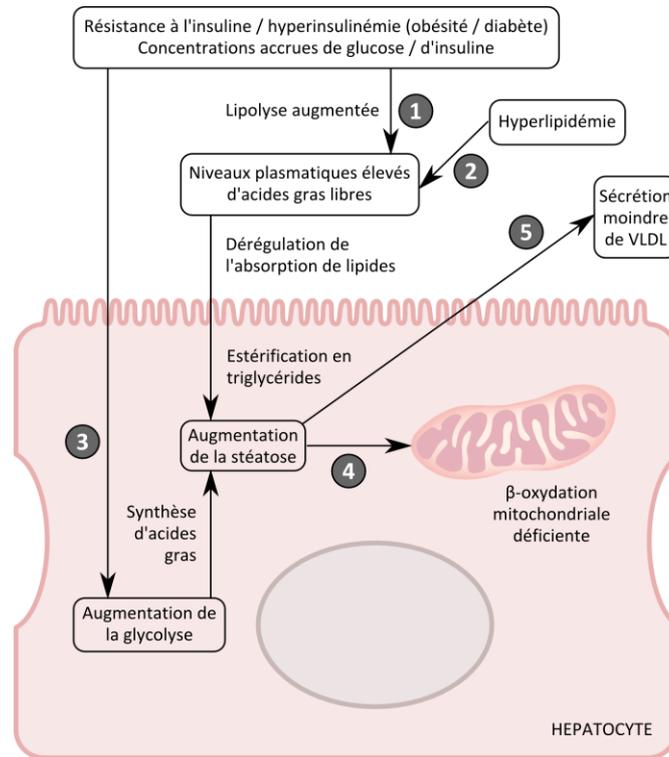
### **1.3.2 Hépatite C chronique**

Dans 75 à 85% des cas d'infection par HCV, l'infection aigüe persiste après les 6 premiers mois suivant la contamination et devient ainsi chronique (Chen and Morgan, 2006). Le taux de progression vers une infection chronique est influencé par de nombreux facteurs, incluant le sexe, l'ethnicité, l'âge au moment de l'infection et la présence ou non de symptômes incluant la jaunisse au cours de l'infection aigüe. Il semblerait en effet que le taux d'infection chronique chez les femmes soit sensiblement moins important que chez les hommes et statistiquement plus élevé chez les Afro-américains que dans le reste de la population américaine (Chen and Morgan, 2006). De plus, le taux d'hépatite chronique chez des patients infectés pendant l'enfance ou l'adolescence est très nettement inférieur (< 30%) que chez les patients infectés à l'âge adulte (Minola et al., 2002). Enfin, plusieurs études ont trouvé une corrélation négative entre le taux d'infection chronique et la présence d'une jaunisse au cours de l'infection aigüe. Cette jaunisse pourrait en effet être associée à une réponse lymphocytaire Th1 et cytokinique à l'infection HCV plus importante, entraînant une meilleure élimination du virus (Lechner et al., 2000). Cette infection virale chronique est un réel problème pour le patient puisqu'elle conduit à l'établissement d'une hépatite C chronique (CHC) avec comme conséquences à terme le développement d'une éventuelle stéatose, d'une fibrose puis d'une cirrhose, et dans certains cas d'un cancer du foie (Figure 4).

#### **1.3.2.1 Stéatose et résistance à l'insuline**

La stéatose, c'est-à-dire l'accumulation intracellulaire de lipides dans les hépatocytes, est fréquente chez les patients atteints de CHC. Elle peut également se développer en cas d'obésité, de diabète de type II, de consommation excessive d'alcool, de malnutrition protéique, de prise de médicaments ou de surcharge glucidique (Asselah et al., 2006). Il est difficile de séparer l'infection par HCV des autres facteurs associés à la stéatose hépatique, néanmoins, une plus forte prévalence a été observée chez les patients présentant une hépatite C chronique (20 à 80%, moyenne 55%) comparée à celle estimée dans la population globale des pays dits développés (20 à 30%) (Machado and Cortez-Pinto, 2009). Le développement d'une stéatose hépatique est fortement lié au phénomène de résistance à l'insuline (Figure 5) observé dans les cas d'obésité, de diabète de type II ou de CHC. Il est intéressant de noter que les patients avec une CHC présentent une prévalence accrue du diabète de type II (plus de 20%) (Serfaty and Capeau, 2009) et de la résistance à l'insuline

(32%) (Moucari et al., 2008). Il existe donc une relation étroite entre HCV et le syndrome métabolique, dont la résistance à l'insuline est le déterminant pathogène.

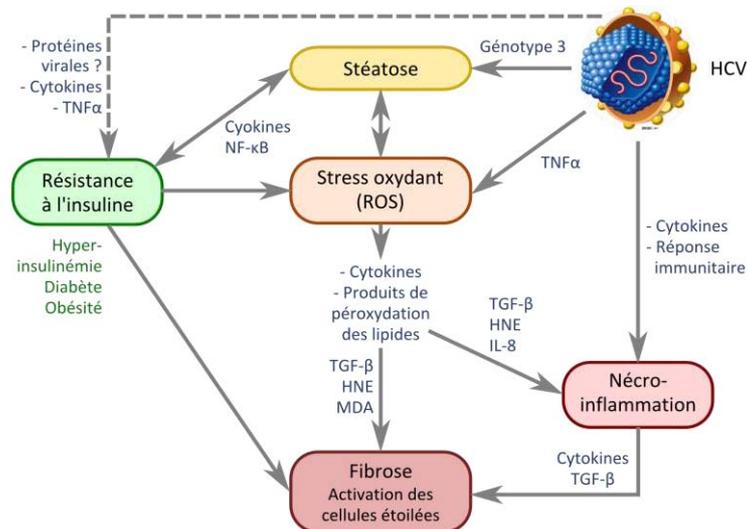


**Figure 5.** Pathophysiologie de la stéatose hépatique.

Une accumulation intra-hépatique de lipides se produit quand l'apport excède la quantité que l'hépatocyte peut sécréter sous forme de lipoprotéines ou oxyder pour produire de l'énergie. Les causes principales de la stéatose hépatique sont les suivantes : (1, 2) Augmentation de l'apport en acides gras causée par des niveaux d'acides gras plasmatiques accrus ; (3) Augmentation de la glycolyse et de la synthèse d'acides gras induite par la résistance à l'insuline ; (4) Défaut de la dégradation des acides gras par  $\beta$ -oxydation ; et (5) Défaut de la sécrétion de lipoprotéines de type VLDL (lipoprotéines de très faible densité). (Extrait de Asselah et al., 2006)

Cette résistance à l'insuline semble être une cause directe de l'infection virale. Le virus inhiberait la signalisation en aval du récepteur à l'insuline dans les hépatocytes infectés, notamment via la surexpression de la protéine phosphatase PP2A et l'inhibition du substrat du récepteur à l'insuline IRS-1 (Bugianesi et al., 2012). Ceci serait à l'origine d'une résistance à l'insuline hépatique jouant un rôle majeur dans le développement ou l'aggravation du syndrome métabolique, prédisposant au développement du diabète de type II, aux maladies cardiovasculaires et à l'évolution vers la stéatose et la fibrose hépatique. Ainsi, la résistance à l'insuline observée chez les patients infectés avec les génotypes 1 et 4 est corrélée à la stéatose et au degré de fibrose, alors que la stéatose n'est corrélée à la charge virale que pour les patients infectés avec le génotype 3 (Fartoux et al., 2005; Moucari et al., 2008). Enfin, de nombreuses études ont démontré une association étroite de l'infection chronique avec une stéatose hépatique dans le cas d'infections avec le génotype 3 uniquement (Asselah et al., 2006). Ceci conduit à l'idée que chez les patients atteints de CHC, il existe 2 types de stéatose : une "stéatose métabolique" avec résistance à l'insuline dans le cas du génotype 1, principalement ; et une "stéatose virale" directement imputable au virus dans le cas du

génotype 3. La relation entre résistance à l'insuline, stéatose et fibrose est complexe et encore discutée, cependant, il semblerait que les modifications métaboliques induites par HCV favorisent la mise en place de la fibrose hépatique (Figure 6) et l'évolution de l'infection chronique, comme nous allons le détailler ci-dessous.



**Figure 6.** Pathogenèse de la fibrose induite par HCV.

La stéatose pourrait être une conséquence directe de l'expression de certaines protéines virales (notamment dans les CHC de génotype 3), mais d'autres causes telles que l'hyperglycémie / hyperinsulinémie résultant du développement d'une résistance à l'insuline chez les patients souffrant de CHC ou la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) par les hépatocytes infectés, contribuent au développement de la stéatose. En retour, la stéatose amplifie la résistance à l'insuline et augmente l'ampleur du stress oxydant. Cependant, l'accumulation intracellulaire de lipides n'est pas fibrogène en soit, mais pourrait faciliter son apparition par l'intermédiaire de la production de ROS. En effet, ceux-ci induisent la sécrétion par les hépatocytes de cytokines et de produits de peroxydation des lipides tels que le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonanal (HNE). Ces molécules sont alors capables de stimuler la synthèse de collagène par les cellules étoilées du foie et de recruter des neutrophiles responsables d'une nécro-inflammation. Enfin, l'inflammation induite par la réponse immunitaire anti-HCV et l'hyperinsulinémie ont également un effet fibrinogène *per se*. (Extrait de Asselah et al., 2006)

### 1.3.2.2 Fibrose

Jusqu'à 80% des patients présentant une CHC développent une fibrose hépatique allant d'une fibrose légère (stade F1, score METAVIR) à une fibrose sévère ou cirrhose (stade F4). L'évolution de la fibrose est généralement lente. Une méta-analyse récente des résultats de 111 études cliniques sur la progression de la fibrose chez les patients avec une CHC (Thein et al., 2008) a permis de calculer une probabilité de progression annuelle de la fibrose : 0,117 entre les stades F0 (absente) et F1 (légère) ; 0,085 entre les stades F1 et F2 (modérée) ; 0,120 entre les stades F2 et F3 (avancée) ; et 0,116 entre les stades F3 et F4 (cirrhose). Ainsi, le temps moyen de développement d'une cirrhose hépatique après infection par HCV est d'environ 30 ans, même s'il dépend d'autres facteurs liés à l'hôte, tels que le sexe, l'âge au moment de l'infection, la surconsommation d'alcool, le degré d'inflammation hépatique et la co-infection avec d'autres virus comme le virus de l'hépatite B (HBV) et le virus de l'immunodéficience humaine (HIV) (Chen and Morgan, 2006). Il a été suggéré

récemment que la stéatose hépatique et la résistance à l'insuline sont toutes deux liées à une évolution défavorable et plus rapide de la fibrose chez les patients présentant une CHC (Figure 6) (Machado and Cortez-Pinto, 2009).

### **1.3.2.3 Cirrhose**

L'infection chronique par HCV peut conduire au développement d'une cirrhose dans approximativement 20% des cas (Figure 4) avec un temps moyen compris entre 20 et 25 ans après infection. Cette cirrhose compensée est fréquemment pas ou peu symptomatique, du fait des capacités régénératrices du foie. Cependant, si les capacités de compensation des fonctions hépatiques sont dépassées du fait d'une trop grande progression de la cirrhose, on assiste à une perte plus ou moins rapide de ces fonctions, appelée décompensation hépatique, aggravant nettement le pronostic vital. Il a été estimé que le risque de décompensation hépatique chez les patients HCV cirrhotiques est de 6% par an, conduisant à un taux de survie de 75% sur 10 ans (Chen and Morgan, 2006). La décompensation est l'un des risques majeurs contribuant à la morbidité du HCV. L'autre risque majeur d'évolution de la cirrhose associée au HCV est le développement de carcinomes hépatocellulaires.

### **1.3.2.4 Carcinome hépatocellulaire**

Les patients infectés par HCV présentent un risque accru de développer un cancer du foie, le facteur de risque étant 17 fois plus important que pour des sujets non infectés (Chen and Morgan, 2006). Le temps moyen de développement d'un carcinome hépatocellulaire (HCC) en cas d'infection est de 25 à 30 ans. Après 20 ans d'infection chronique, approximativement 4% des patients ont développé un HCC (Di Bisceglie, 2000). En outre, le taux annuel de développement d'un HCC une fois la cirrhose établie est estimé entre 1 et 4%, voire plus au Japon (Liang and Heller, 2004), ce qui souligne l'intérêt de surveiller étroitement l'apparition du cancer chez les patients HCV qui présentent une cirrhose. En effet, la décompensation hépatique et le HCC sont les deux principales causes de transplantation hépatique et de mortalité associées aux infections par HCV.

### **1.3.3 Manifestations extra-hépatiques**

HCV a également été associé à différentes manifestations extra-hépatiques, incluant notamment les systèmes rénaux, dermatologiques, hématologiques et rhumatologiques. La plus fréquente d'entre elles est la cryoglobulinémie mixte qui affecte approximativement 50% des patients avec une CHC, même si sa prévalence est discutée étant donné qu'elle est asymptomatique dans la plupart des cas (Agnello and De Rosa, 2004; Webster et al., 2009). La cryoglobulinémie mixte se caractérise par la présence dans le sang d'immunoglobulines qui précipitent pour des températures inférieures à 37°C, conduisant à des dépôts de complexes immuns dans les vaisseaux de moyenne et de petite taille, entraînant l'apparition de divers symptômes tels qu'une vasculite cutanée, une glomérulonéphrite ou une neuropathie périphérique. Ces cas de cryoglobulinémie mixte ainsi que d'autres manifestations extra-hépatiques pourraient s'expliquer par un lymphotropisme partiel du HCV suggéré de nombreuses fois dans la littérature (Webster et al., 2009). HCV serait également capable d'infecter des cellules neuroépithéliales et endothéliales du cerveau, et pourrait ainsi être responsable des altérations du système nerveux central observées chez les patients (Fletcher et al., 2010, 2011).

## 1.4 Réponse immunitaire de l'hôte

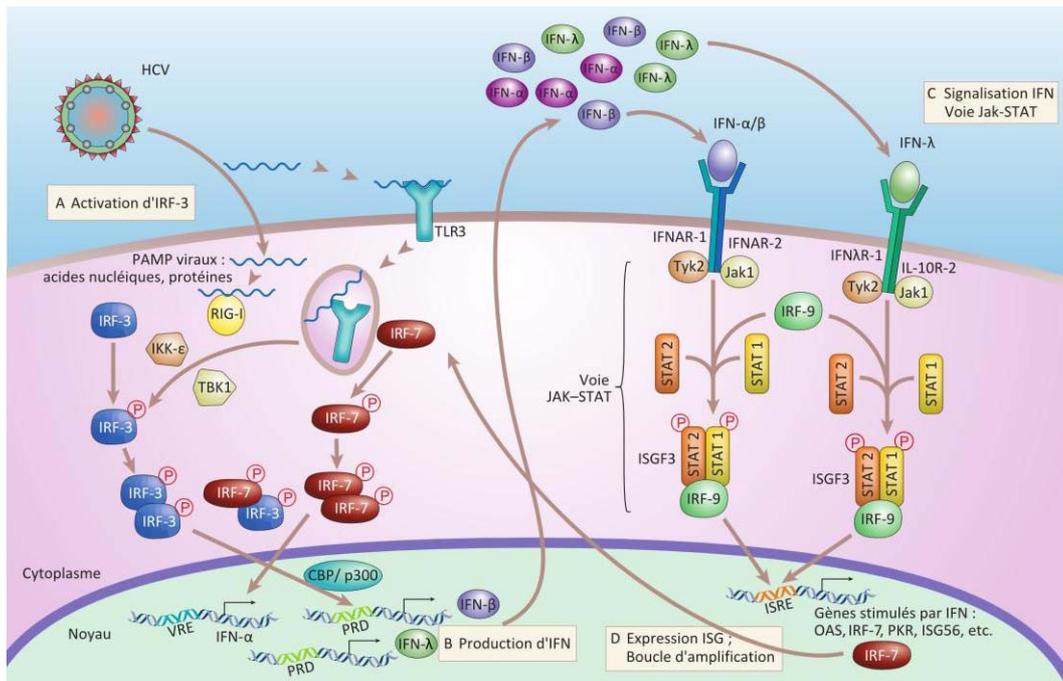
La réponse immunitaire de l'hôte à l'infection par HCV est complexe et implique de nombreux facteurs des réponses immunitaires innées et adaptatives. La première barrière de l'organisme, à savoir l'immunité innée des barrières anatomiques (peau et muqueuses), joue un rôle mineur dans l'infection par HCV étant donné que la quasi-totalité des contaminations a lieu par contact sanguin direct. Les deux premières composantes de l'immunité contre HCV sont donc : l'immunité innée intracellulaire, pour empêcher la réplication et la propagation du virus au sein des hépatocytes infectés, et l'immunité innée cellulaire, opérée conjointement par les cellules de Kupffer, les cellules dendritiques (DC) et les lymphocytes NK (Natural Killer) et NKT. L'efficacité de cette réponse immunitaire innée joue un rôle critique dans le déclenchement des réponses immunitaires adaptatives (humorale et cellulaire) ainsi que dans l'ampleur de leurs activités antivirales. Une étude réalisée sur des Chimpanzés a permis de suggérer que l'immunité innée et l'immunité adaptative peuvent induire de concert une immunité protectrice contre l'infection par HCV (Barth et al., 2011). Nous allons détailler ci-dessous chacune de ces réponses immunitaires à l'infection virale et montrer en quoi HCV a développé des stratégies d'échappement et d'évasion lui permettant de persister chez les patients chroniquement infectés.

### 1.4.1 Réponse immunitaire innée

#### 1.4.1.1 Immunité innée : Le rôle de l'hépatocyte

Les cellules professionnelles de l'immunité, telles que les cellules dendritiques (DC) et les macrophages résidents du foie (cellules de Kupffer), sont capables de détecter la présence de pathogènes à l'aide de récepteurs spécifiques appelés PRR (Pathogen Recognition Receptors). Ces récepteurs membranaires, endosomaux ou cytosoliques sont capables de reconnaître différents ligands, appelés motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP) en cas d'infection. Cependant, l'expression et la fonctionnalité de ces PRR ne sont pas restreintes aux cellules immunitaires, mais sont également retrouvées, avec une importance moindre, dans la plupart des cellules et notamment dans les hépatocytes (Seki and Brenner, 2008). Les PRR sont regroupés en plusieurs familles en fonction de leur homologie structurale : les TLR (Toll-Like Receptors), les NLR (NOD-Like Receptors) et les RLR (RIG-Like receptors). Les TLR sont tous membranaires, présents à la surface des cellules ou dans les endosomes, alors que les NLR et les RLR sont cytoplasmiques. Chaque PRR possède une forte affinité pour un PAMP particulier. Par exemple, la détection d'une infection bactérienne peut se faire directement à la surface cellulaire avec une reconnaissance spécifique du lipopolysaccharide (LPS) bactérien par TLR-4 et de la flagelline par TLR-5. La liaison du PAMP à son récepteur entraîne l'activation de ce dernier et la transduction d'un signal conduisant à l'activation de facteurs de transcription tels que NF- $\kappa$ B, AP1 (Activator Protein 1) et les IRF (Interferon Regulatory Factors), qui vont à leur tour permettre l'expression de gènes impliqués dans la réponse antibactérienne et antivirale de la cellule (Seki and Brenner, 2008). Toutes les voies de signalisation empruntées par les PRR utilisent des protéines adaptatrices indispensables telles que MyD88 (Myeloid Differentiation factor 88), TRIF (TIR-domain containing adaptor inducing interferon (IFN)- $\beta$ ) ou IPS-1 (IFN- $\beta$  promoter stimulator 1), qui jouent ainsi un rôle essentiel dans l'établissement de la réponse innée cellulaire.

La reconnaissance cellulaire du HCV s'effectue quant à elle par l'intermédiaire de PAMP et de PRR différents. L'ARN viral est reconnu par TLR-3 et par RIG-I (Retinoïc-Acid-Inducible Gene I) sous forme d'ARN bicaténaire, soit suite à la lyse de cellules voisines infectées, soit au cours de la réplication virale, soit au niveau des structures non codantes du génome qui sont très structurées et



**Figure 7.** Réponse immunitaire innée intracellulaire à HCV.

(A) La fixation du PAMP viral (ARN bicaténaire) à RIG-I ou TLR3 entraîne la phosphorylation et l'activation d'IRF-3 (et d'IRF-7) qui se dimérise et migre alors vers le noyau, interagissant avec d'autres facteurs de transcription comme CBP/p300, se lie au promoteur de gènes cibles contenant un domaine régulateur positif (PRD), comme le gène de l'IFN- $\beta$  et de l'IFN- $\lambda$ , et permet leur expression.

(B) L'activation d'IRF-3 entraîne la production et la sécrétion d'IFN par les cellules infectées.

(C) La liaison de l'IFN- $\beta$  sur le récepteur des IFN de type I ( $\alpha$  et  $\beta$ ) et de l'IFN- $\lambda$  sur le récepteur des IFN de type III, à la surface de la cellule productrice ou des cellules voisines, permet l'activation de la voie JAK-STAT, la formation du facteur de transcription ISGF3 (composé de STAT1, STAT2 et IRF-9), sa fixation sur le promoteur de gènes possédant un élément de réponse à l'IFN (ISRE), et l'expression des gènes stimulés par l'IFN (ISG) qui possèdent une activité antivirale.

(D) IRF-7 est à la fois un facteur de transcription et un ISG. Son expression permet la formation d'un nouveau facteur de transcription composé par l'hétérodimère IRF-3/IRF-7 ou l'homodimère IRF-7, capable de se fixer sur le promoteur de gènes possédant un élément de réponse au virus (VRE) tel que le gène de l'IFN- $\alpha$  et d'activer leur expression. La production d'IFN- $\alpha$  permet ainsi une boucle d'amplification de la réponse innée antivirale dans l'hépatocyte infecté.

(Adapté de Gale and Foy, 2005)

présentent de courtes portions bicaténaires, comme nous le verrons plus tard (cf. §2.1) (Gale and Foy, 2005; Liu and Gale, 2010). Cette reconnaissance induit l'activation des récepteurs ainsi que des facteurs de régulation de l'interféron IRF-3 et IRF-7. Ces derniers entraînent alors la transcription des gènes des interférons de type I (IFN- $\alpha$  et IFN- $\beta$ ) et de type III (IFN- $\lambda$ ) qui sont alors sécrétés par les cellules infectées. Dans un deuxième temps, la fixation des IFN sur leurs récepteurs conduit à l'expression de gènes stimulés par l'IFN (ISG) qui codent des protéines possédant des activités antivirales diverses, agissant dans la cellule infectée ainsi que dans les cellules saines voisines par action paracrine, et permettant la mise en place d'un état antiviral et son amplification (Figure 7) (Gale and Foy, 2005; Rehmann, 2009). Finalement, la détection de l'infection virale par les hépatocytes permet la mise en place d'un état antiviral local grâce à l'expression d'ISG, qui devrait

ralentir ou supprimer la propagation virale au cours de l'infection. Chez les patients chroniquement infectés, on observe en effet une forte augmentation de l'expression des ISG dans le foie, qui ne corrèle cependant pas avec une éradication de l'infection (Sklan et al., 2009). Il se pourrait que l'immunité innée intrahépatocytaire n'ait pas été suffisante chez ces patients chroniquement infectés pour éliminer le virus.

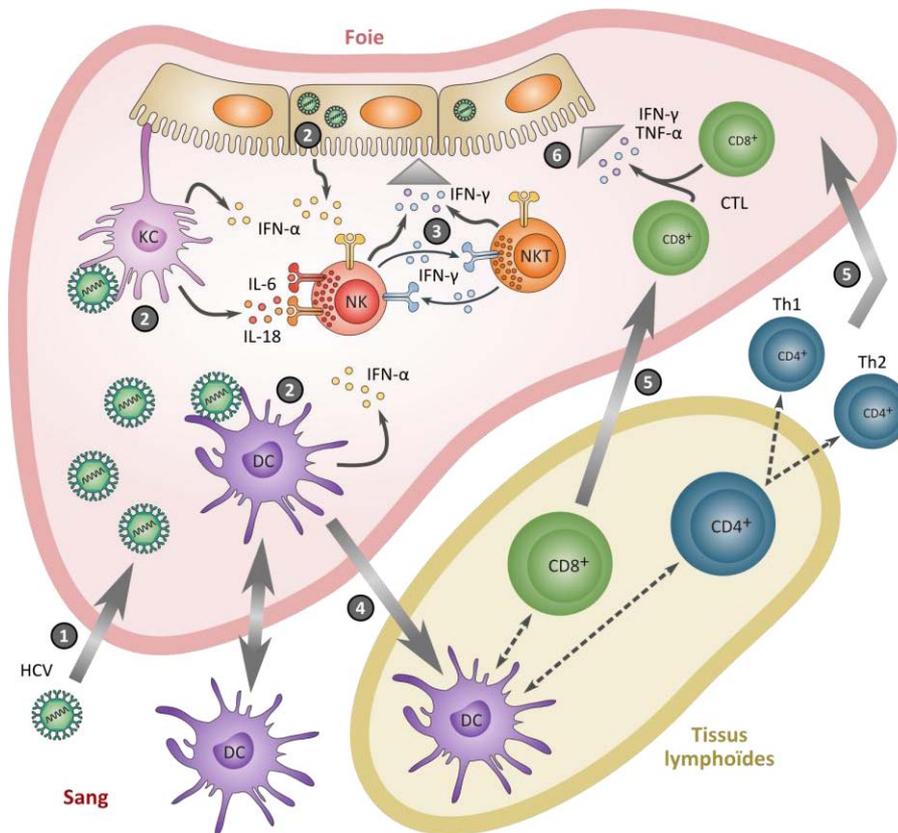
#### **1.4.1.2 Immunité innée : Le rôle des cellules immunitaires**

Une fois les hépatocytes infectés, ils répliquent continuellement le virus et sécrètent de nouvelles particules virales dans la circulation, permettant une propagation de l'infection. La seconde ligne de défense de l'organisme vis-à-vis de l'infection est alors composée des lymphocytes NK et NKT. Les cellules NK possèdent divers récepteurs dont certains sont activateurs et d'autres inhibiteurs. C'est la balance entre l'expression de ces récepteurs antagonistes et la liaison à leurs ligands spécifiques qui régule l'activité de ces cellules et leur action cytotoxique vis-à-vis des cellules potentiellement infectées (Raulet and Vance, 2006). Les cellules NKT sont quant à elles des lymphocytes particuliers exprimant à la fois des récepteurs des cellules T (TCR) et des marqueurs de cellules NK. Elles peuvent être divisées en plusieurs sous-populations aux rôles distincts en encore peu connus (Kronenberg and Gapin, 2002). Ces cellules NK et NKT sont recrutées en grand nombre dans le foie en cas d'inflammation et leur activité est, entre autres, régulée par les cytokines sécrétées par les cellules de Kupffer, des macrophages spécialisés résidants du foie (Shi et al., 2011). Il semblerait qu'à l'état basal les cellules de Kupffer contrôlent l'activation des cellules NK par la sécrétion d'interleukine 10 (IL-10), alors que la reconnaissance d'ARN viral double brin par le récepteur TLR3 des cellules de Kupffer lors de l'infection entraîne la sécrétion d'IL-6 et d'IL-18 par ces dernières et l'activation des cellules NK recrutées au niveau du foie (Figure 8) (Shi et al., 2011). Dans le cas de l'infection par HCV, la forte sécrétion d'IFN de type I et III au cours de l'hépatite aigüe par les hépatocytes infectés, les cellules de Kupffer et les DC, entraîne également une forte activation des cellules NK et NKT qui sécrètent alors de l'IFN- $\gamma$  à activité antivirale non cytolytique (Kanto and Hayashi, 2007). Les DC activées par les PAMP viraux migrent vers les tissus lymphoïdes où elles acquièrent leur phénotype mature de DC plasmacytoïdes (pDC) ou de DC myéloïdes (mDC), présentant des profils de sécrétion cytokinique différents et stimulant différents effecteurs incluant les lymphocytes B et T (Figure 8). Il a été décrit récemment que le routage intracellulaire des virions HCV après phagocytose était différent dans les pDC et dans les mDC, avec présentation respectivement aux lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et T CD4<sup>+</sup>, attribuant un rôle distinct à chaque population de DC dans l'activation de la réponse adaptative (Lambotin et al., 2010). Le bon déroulement de cette réponse immunitaire innée est essentiel à la mise en place d'une réponse adaptative efficace, jouant un rôle critique dans l'issue de l'infection aigüe.

### **1.4.2 Réponse immunitaire adaptative**

#### **1.4.2.1 Immunité adaptative humorale**

La réponse immunitaire adaptative humorale joue un rôle important dans le contrôle de l'infection de nombreux pathogènes. Elle permet la mise en place d'une immunité humorale via des anticorps spécifiques qui permettent une neutralisation ou une opsonisation des agents infectieux. Ce principe est couramment utilisé pour mettre en place une immunité protectrice grâce à la vaccination. Dans le cas de l'infection par HCV, cette réponse humorale met plus de 4 semaines à se développer (Netski et al., 2005) et son rôle dans le contrôle de l'infection est débattu. En effet, la détection d'anticorps anti-HCV dans le sérum des patients et la démonstration de leur pouvoir



**Figure 8.** Les acteurs clef de la réponse immunitaire hépatique.

L'entrée du HCV dans la circulation hépatique et l'infection des hépatocytes (1) entraîne une forte réponse immunitaire innée des hépatocytes, des cellules de Kupffer (KC) et des cellules dendritiques (DC), suite à la reconnaissance des PAMP viraux (ARN bicaténaire principalement) (Figure 7). Ces cellules sécrètent alors, entre autres, de grandes quantités d'IFN, ainsi que de l'IL-6 et de l'IL-18 pour les KC, qui vont permettre une activation des cellules NK et NKT (2). Ces dernières acquièrent ainsi un phénotype cytotoxique avec augmentation de l'expression de ligands inducteurs de l'apoptose, de perforine et de granzymes, et sécrètent également de grandes quantités d'IFN- $\gamma$ . Cette cytokine permet une boucle d'amplification de l'activation des cellules NK et NKT et possède également une action antivirale non cytolytique sur la réplication d'HCV dans les hépatocytes (3). Une fois activées par la reconnaissance de PAMP viraux, les DC migrent vers les tissus lymphoïdes où elles vont permettre l'activation et la spécialisation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> en lymphocytes T auxiliaires (Th1 et Th2) et en lymphocytes T cytotoxiques (CTL) (4). Ces lymphocytes T migrent ensuite vers le foie (5) pour effectuer leur action antivirale, cruciale dans le processus de clairance du HCV, et passant notamment par la sécrétion abondante d'IFN- $\gamma$  et de TNF- $\alpha$  par les CTL (6). (Adapté de Kanto and Hayashi, 2007; Shi et al., 2011)

neutralisant a longtemps posé problème par manque de systèmes de culture *in vitro*. Néanmoins, il a été montré que la résolution spontanée de l'infection pouvait avoir lieu sans réponse humorale spécifique et que le taux d'anticorps neutralisants est en général supérieur au cours de l'infection chronique (Bowen and Walker, 2005; Netski et al., 2005). Ces résultats suggèrent un rôle mineur de la réponse humorale dans le contrôle de l'infection par HCV. Cependant, d'autres études ciblées où la source d'infection nosocomiale était bien identifiée semblent démontrer un rôle de cette réponse humorale dans le contrôle de l'infection avec une corrélation entre la précocité d'apparition des

anticorps neutralisants et la résolution de l'infection (Zeisel et al., 2008). La réponse adaptative humorale jouerait donc un rôle dans le contrôle précoce de l'infection, en collaboration avec la réponse adaptative cellulaire que nous allons détailler ci-dessous.

#### **1.4.2.2 Immunité adaptative cellulaire**

Une fois activés par les DC au niveau des tissus lymphoïdes, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> migrent vers le foie et jouent un rôle majeur dans le succès de la réponse antivirale et dans la résolution de l'infection aigüe (Rehermann, 2009). Il a été en effet montré chez des patients (Lechner et al., 2000; Thimme et al., 2001) et chez des chimpanzés (Thimme et al., 2002) que l'activité maximale des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> coïncidait avec la diminution de l'ARN viral, que la résolution de l'infection virale était corrélée avec l'intensité de l'activité des lymphocytes T et que seul des chimpanzés présentant une clairance totale ou transitoire du virus avait une forte activité lymphocytaire au niveau du foie avec sécrétion d'IFN- $\gamma$  qui pourrait être impliqué dans une inhibition directe et non cytolytique de la réplication virale (Thimme et al., 2002). Il semblerait que des mécanismes d'action cytolytiques et non cytolytiques (via IFN- $\gamma$ ) des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> soient impliqués dans le contrôle de la réplication virale. La diversité des épitopes viraux reconnus par les TCR des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, et plus particulièrement des lymphocytes T cytotoxiques (CTL), a également été associée à l'issue de l'infection virale. En effet, les patients développant une infection chronique semblent posséder moins de CTL spécifiques du virus, ces derniers reconnaissant une diversité d'épitopes viraux moindre (Bowen and Walker, 2005). L'influence de la diversité de répertoire des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> reste, quant à elle, mal déterminée. Ainsi, l'élimination du virus et la guérison des patients présentant une infection aigüe seraient étroitement reliées à la précocité, l'intensité, la diversité et la localisation hépatique de la réponse HCV-spécifique des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>.

#### **1.4.3 Echappement viral**

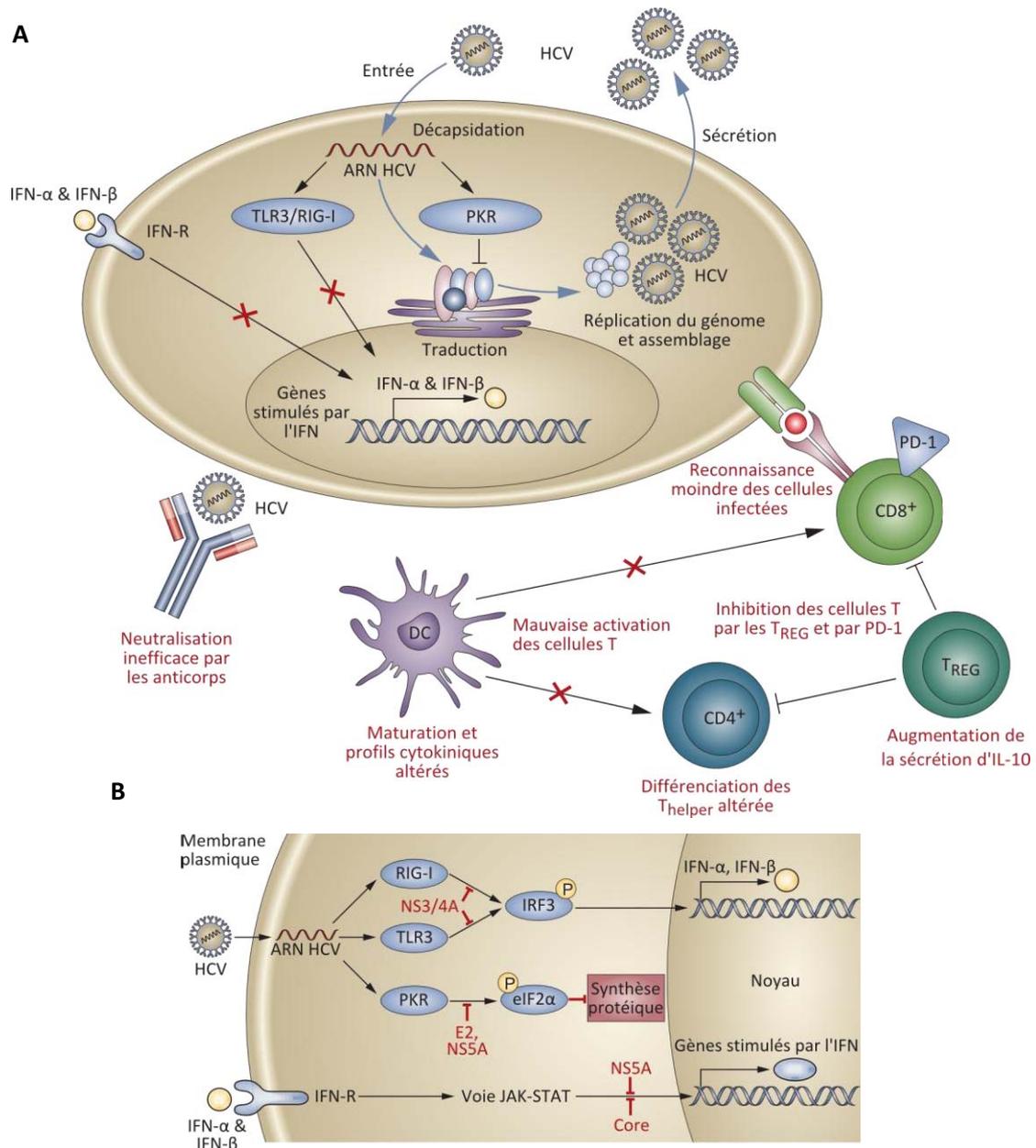
Malgré le nombre et la diversité des réponses immunitaires dirigées contre HCV, une infection virale chronique s'installe et persiste chez 75 à 85% des patients. En effet, HCV a développé de nombreuses stratégies pour lutter contre la réponse antivirale de l'hôte en ciblant chacune des étapes critiques de la réponse immunitaire induite (Rehermann, 2009; Sklan et al., 2009). De nombreuses études se sont intéressées aux stratégies virales d'échappement aux défenses intracellulaires de l'hôte, la première stratégie immunitaire antivirale que nous avons détaillée (Gale and Foy, 2005). Brièvement, HCV est capable d'inhiber directement la signalisation en aval de TLR-3 et de RIG-I grâce à la protéase virale (NS3/4A, cf. §2.1.3.5) qui peut cliver et inactiver les protéines adaptatrices TRIF (Li et al., 2005) et IPS-1 (Meylan et al., 2005; Sumpter et al., 2005; Saito et al., 2008), respectivement (Figure 9). Une autre voie de détection des ARN bicaténaires dans le cytoplasme passe par la protéine kinase dépendante de l'ARN (PKR) qui est alors capable de s'auto-activer par phosphorylation et d'inhiber la traduction cellulaire en phosphorylant le facteur d'initiation de la traduction eIF2 $\alpha$ . La PKR est induite par les IFN de type I et entraîne une diminution de la synthèse protéique allant à l'encontre d'une réplication virale active. Cependant, il existe des données contradictoires concernant le rôle de la PKR dans l'infection virale. Il a été décrit en effet que certaines protéines virales comme la glycoprotéine d'enveloppe gpE2 seraient capables d'inhiber l'activité de la PKR (Taylor et al., 1999), alors qu'une étude récente suggère que la réplication virale pourrait initialement stimuler la phosphorylation et l'activité de la PKR, avec pour conséquences de réduire la traduction des ISG mais pas celle du génome viral (Garaigorta and Chisari, 2009). L'inhibition de la PKR interviendrait à un stade plus tardif et chronique de l'infection. D'autres

mécanismes d'échappement viral s'intéressent à l'inhibition de la voie de signalisation JAK-STAT (Janus Kinase - Signal Transducer and Activator of Transcription) impliquée dans la réponse aux IFN de type I (Figure 7, Figure 9). Entre autres, les protéines virales sont capables d'induire l'expression de la protéine phosphatase 2 A (PP2A) (Duong et al., 2004) et d'un suppresseur de signal cytotinique (SOCS-3) (Bode et al., 2003) qui interfèrent avec la voie JAK-STAT. De plus, une des protéines virales non structurales, NS5A, induit l'expression d'interleukine 8 (IL-8) qui atténue la fonctionnalité du facteur de transcription de la voie JAK-STAT et diminue l'expression des ISG (Polyak et al., 2001). Enfin, l'induction de l'autophagie par HCV aurait également pour conséquence une inhibition de la réponse IFN à l'encontre du virus (Ke and Chen, 2011b).

HCV intervient également au niveau des cellules de l'immunité innée pour inhiber la réponse immunitaire, cependant, les données à ce sujet sont beaucoup plus éparses et contradictoires. Il a été décrit *in vitro* que la glycoprotéine d'enveloppe gpE2 serait capable d'inhiber la fonction des cellules NK en se liant au récepteur CD81 présent à leur surface, mais ces résultats n'ont pas été reproduits avec un virus complet ou *in vivo* (Rehermann, 2009). Il semblerait également que le contact cellulaire entre cellules NK et hépatocytes infectés entraîne une diminution de l'expression du récepteur activateur NKG2D *in vitro* (Yoon et al., 2011). Cependant, une activation des cellules NK avec surexpression de NKG2D a pu être observée *in vivo* au cours de l'infection aiguë, indifféremment du devenir de l'infection (Amadei et al., 2010). Le rôle direct du virus sur les cellules NK est donc mal connu, même si on observe chez les patients une production accrue de TGF- $\beta$  (Tumor Growth Factor  $\beta$ ) et d'IL-10 par ces cellules, ce qui entraînerait une inhibition de leur activité et de la réponse immunitaire adaptative (Sène et al., 2010). HCV inhiberait également la maturation des DC qui sécrèteraient moins d'IFN- $\alpha$  et ne permettraient plus une bonne différenciation des cellules de l'immunité adaptative, à savoir les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> (Figure 9) (Perrin-Cocon et al., 2008; Rehermann, 2009; Rodrigue-Gervais et al., 2010).

En plus de ces actions sur l'immunité innée, HCV entraîne de nombreux défauts de fonctionnalité au niveau des cellules de l'immunité adaptative. Notamment, HCV inhibe les cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques du virus par des lymphocytes T régulateurs plus nombreux et plus actifs que chez les patients sains ou par la surexpression de la protéine PD-1 (Programmed cell Death 1) entraînant un épuisement des lymphocytes qui sécrètent moins d'IFN- $\gamma$  à activité antivirale et qui ont une activité cytolytique moindre (Figure 9) (Sklan et al., 2009). De nombreux autres défauts des lymphocytes T ont été décrits dans la littérature, principalement au cours de la phase chronique de l'infection par HCV (Rehermann, 2009; Sklan et al., 2009). L'échappement à la réponse immunitaire portée par les lymphocytes T est également relié à l'apparition de mutations affectant l'apprêtement des antigènes viraux par les cellules infectées, leur liaison aux molécules du MHC, et leur reconnaissance par les TCR (Rehermann, 2009). Enfin, le dernier mécanisme d'échappement viral concerne la réponse humorale. Les anticorps neutralisants des patients sont dirigés contre la glycoprotéine d'enveloppe gpE2, or celle-ci possède les régions les plus variables de toute la polyprotéine virale, à savoir les régions HVR-1 et 2 (Hyper-Variable Region) (cf. §2.1.3.2). Ainsi, une fois la réponse humorale établie, avec l'apparition d'anticorps neutralisants, il y a sélection de variants viraux qui échappent à la neutralisation grâce à la mutation de gpE2.

Pour conclure, l'hôte possède de nombreux moyens de lutter contre l'infection virale, mais le virus a élaboré une stratégie pour échapper à chaque étape de la réponse immunitaire de l'hôte et ainsi permettre la persistance virale et le développement d'une infection chronique.



**Figure 9.** Stratégies virales d'échappement à la réponse immunitaire.

(A) Stratégies d'échappement aux réponses innées et adaptatives. L'échappement à la réponse innée passe principalement par l'inhibition de la signalisation en aval de RIG-I, de TLR-3 et du récepteur aux IFN de type I (IFN-R), comme détaillé sur la figure B. Les étapes clés de l'échappement à la réponse immunitaire adaptative sont présentées sur ce schéma. HCV altère la fonction des cellules dendritiques (DC) et limite leur capacité à stimuler une réponse immunitaire robuste et spécifique des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>. La dérégulation de PD-1 et la production accrue d'IL-10 diminuent également la fonctionnalité des lymphocytes T permettant l'échappement viral. Enfin, la mutation des glycoprotéines virales permet à HCV d'échapper à la réponse humorale.

(B) Inhibition de la réponse innée intracellulaire par HCV. La protéase virale NS3/4A bloque la signalisation en aval des PRR RIG-I et TLR3 en clivant respectivement IPS-1 et TRIF, 2 adaptateurs indispensables à ces voies de signalisation. Les protéines virales NS5A et core bloquent la signalisation de l'IFN via une inhibition de la voie JAK-STAT. Finalement, les protéines virales E2 et NS5A inhibent l'activité de la PKR, impliquée dans l'inhibition de la synthèse protéique cellulaire.

(Extrait de Sklan et al., 2009)

## 1.5 Traitements antiviraux

L'infection par HCV étant peu symptomatique, l'objectif majeur des thérapies est de prévenir la progression de la maladie hépatique et d'empêcher l'apparition d'une cirrhose, d'une décompensation hépatique ou d'un carcinome. Dans certains cas cependant, le traitement peut être rendu nécessaire pour prévenir la transmission virale, améliorer les symptômes ou réduire les manifestations extra-hépatiques. La décision de traiter ou non les patients dépend de nombreux facteurs, tels que la charge virale, le génotype, la sévérité de la maladie hépatique et les facteurs de risque liés à l'infection (Nash et al., 2009).

### 1.5.1 Bithérapie interféron / ribavirine

La première molécule utilisée pour le traitement de l'hépatite C était l'IFN- $\alpha$  (type 2a ou 2b), acceptée par la FDA en 1991. La qualité du traitement a ensuite évolué avec l'utilisation d'une bithérapie composée d'IFN- $\alpha$  et de ribavirine qui a été approuvée et implémentée en 1998, suite à la démonstration d'une amélioration significative du taux de réponses virologiques soutenues (SVR) après la co-administration de ribavirine. L'IFN- $\alpha$  a ensuite été remplacé par des IFN pégylés (pegIFN- $\alpha$ ), supérieurs à leurs analogues non conjugués (Manns et al., 2001; Fried et al., 2002), permettant ainsi l'administration du seul traitement disponible jusqu'en 2011, une bithérapie composée de pegIFN- $\alpha$  et de ribavirine. Le taux moyen de SVR chez les patients sous bithérapie est de 54-56%, mais il varie en fonction des génotypes, avec 42-46% pour les infections de génotype 1 contre 76-80% pour les infections de génotypes 2 et 3. Cependant, ce traitement possède de nombreux effets secondaires comme des réactions au site d'injection des pegIFN, des symptômes grippaux, et des effets secondaires psychiatriques tels que dépression, irritabilité et insomnies (Manns et al., 2001; Fried et al., 2002). Ces effets indésirables ont pour conséquence une mauvaise observance du traitement chez de nombreux patients, remettant en cause le bénéfice de la thérapie. En effet, les patients prenant au moins 80% de la dose prévue pour chaque médicament, pendant au moins 80% de la durée prévue ont une probabilité de SVR plus importante que les patients moins observants (62% contre 53%) (Manns et al., 2006). Pour traiter au mieux les patients, il est important de suivre l'évolution de la charge virale, des constantes hépatiques, sanguines et rénales, et des effets secondaires afin d'adapter la thérapie. L'utilisation de marqueurs prédictifs permet aussi d'identifier et de cibler préférentiellement les patients présentant une probabilité de rémission plus importante, justifiant la poursuite du traitement en dépit d'éventuels effets secondaires indésirables.

### 1.5.2 Marqueurs prédictifs de la réponse au traitement

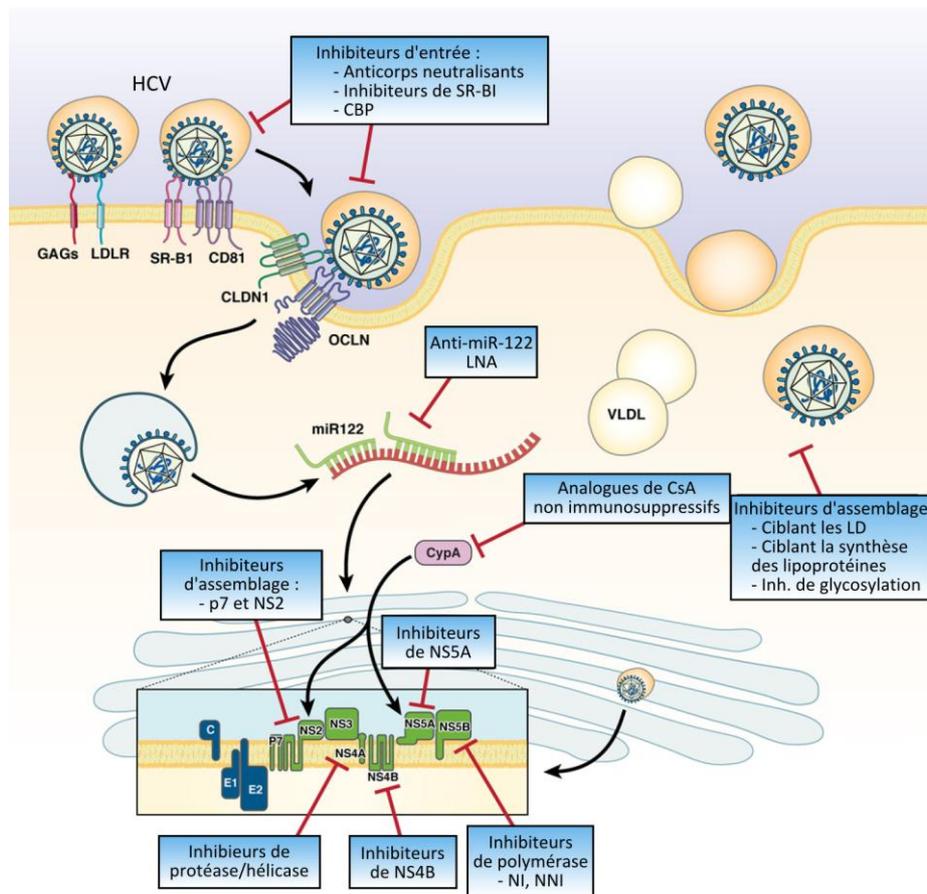
De nombreuses études ont confirmé que le génotype viral est un facteur important de la réponse au traitement (Le Guillou-Guillemette et al., 2007). Comme nous l'avons vu précédemment, les patients infectés par le génotype 1 répondent moins bien au traitement, et nécessitent ainsi une durée de traitement plus importante avec des doses de ribavirine plus fortes. De nombreux marqueurs prédictifs d'une réponse favorable à la thérapie ont été identifiés. Ils reposent sur des critères épidémiologiques, virologiques, physiologiques ou histologiques (Kau et al., 2008; Ghany et al., 2009). Entre autres, le taux de SVR observé après traitement est amélioré quand : la charge virale initiale est faible ; les doses de pegIFN- $\alpha$  et de ribavirine sont suffisantes ; le patient est de sexe féminin, âgé de moins de 40 ans et non afro-américain ; il n'y a pas de co-infection avec HIV ; la biopsie hépatique ne présente ni fibrose avancée, ni cirrhose ; et l'observance au traitement est correcte. La présence d'une résistance à l'insuline, induite par le virus et/ou liée à la stéatose, à la fibrose ou à un diabète, a quant à elle une influence défavorable sur l'issue du traitement, au moins

pour les infections de génotype 1 (Romero-Gómez et al., 2005). Récemment, l'influence des lipides sériques sur l'issue du traitement a été étudiée par plusieurs groupes. La quantité de cholestérol associé aux lipoprotéines de faible densité (LDL) et à l'apolipoprotéine B (apoB) est associée positivement à la réponse au traitement alors que la quantité sérique de triglycérides est prédictive d'une réponse moindre (Sheridan et al., 2009; Ramcharran et al., 2010). Par contre, la valeur prédictive du cholestérol associé aux lipoprotéines de forte densité (HDL) est moins marquée et dépend du genre. L'intérêt de ces marqueurs lipidiques est leur relative simplicité de quantification permettant d'apporter une prédiction supplémentaire, en plus des paramètres cités ci-dessus. Un autre marqueur sérique aisément quantifiable est la protéine de 10 kDa inducible par IFN- $\gamma$  (IP-10 ou CXCL10). C'est une chimiokine produite par les hépatocytes en réponse à une stimulation par l'IFN- $\gamma$ , possédant une activité chimiotactique pour les lymphocytes T, les cellules NK et les monocytes. Une quantité faible d'IP-10 chez les patients avant le traitement est en faveur d'une réponse virologique rapide (RVR) voire soutenue (SVR) (Lagging et al., 2006). Ce marqueur possède une valeur prédictive positive supérieure à 70% (probabilité d'avoir une réponse positive au traitement si le taux d'IP-10 est bas avant traitement). Finalement, depuis quelques années, un intérêt tout particulier est porté sur de nouveaux marqueurs prédictifs d'origine génétique, le plus important d'entre eux étant un polymorphisme présent sur le gène *IL28B* codant pour l'IFN- $\lambda$ -3. Ce polymorphisme est très fortement associé à la réussite du traitement que ce soit en termes de SVR (infection chronique) (Ge et al., 2009) ou en termes de clairance virale spontanée (infection aiguë) (Thomas et al., 2009). Il est intéressant de noter que ce polymorphisme génétique permet d'expliquer, du moins partiellement, les différences de réponse au traitement observées en fonction de l'origine ethnique des patients. La découverte du rôle de l'IFN- $\lambda$  au cours de l'infection HCV permettra dans un futur proche son utilisation en clinique pour traiter les patients, en le substituant aux IFN- $\alpha$ . En effet, l'IFN- $\lambda$  possède également une action antivirale *in vitro* (Diegelmann et al., 2010) et *in vivo* (Muir et al., 2010; Pagliaccetti and Robek, 2010), mais il présente moins d'effets secondaires du fait de la présence moindre de son récepteur sur les cellules du système hématopoïétique (Pagliaccetti and Robek, 2010). Finalement, le développement de ces nouveaux marqueurs à forte valeur prédictive positive va permettre de mieux adapter les traitements aux patients pour une efficacité maximale avec un coût et une toxicité réduits.

### **1.5.3 Nouvelles molécules antivirales**

Le traitement préconisé pour lutter contre HCV, composé d'interférons  $\alpha$  pégylés et de ribavirine, n'a pas évolué pendant 10 ans par manque de systèmes d'étude *in vitro* permettant le développement d'antiviraux spécifiques. Depuis le début des années 2000, de nombreux antiviraux à action directe (DAA) ont été développés grâce à l'utilisation de systèmes cellulaires de réplication de l'ARN viral (cf. §5.2.1.1). Ces nouvelles molécules sont principalement des inhibiteurs de la polymérase virale, de la protéase virale et plus récemment de la protéine NS5A. D'autres activités virales font également l'objet de développement d'antiviraux, incluant la viroporine p7 et la protéine NS2. Enfin, d'autres molécules ciblant des facteurs de l'hôte indispensables à la réplication virale comme des inhibiteurs de cyclophiline ou d' $\alpha$ -glucosidase sont également en cours de développement (Webster et al., 2009). Les 2 premières DAA mises sur le marché en 2011 sont des antiviraux à action directe de première génération, ciblant la protéase virale NS3/4A. Il s'agit du telaprevir (TPV; Incivo®) et du boceprevir (BOC; Victrelis®), approuvés pour le traitement des infections virales chroniques de génotype 1. Leur utilisation en triple thérapie avec pegIFN- $\alpha$  et ribavirine chez des patients infectés par le génotype 1 améliore le pourcentage de SVR à l'issue du

traitement (de 45% à 70%) (Moradpour et al., 2012). Ces médicaments de première génération ont une efficacité très réduite en monothérapie puisqu'ils aboutissent à l'émergence rapide de populations virales résistantes (Le Guillou-Guillemette et al., 2007; Moradpour et al., 2012). Néanmoins, ils restent une avancée majeure pour le traitement de l'hépatite C chronique et préparent le terrain pour les nouvelles générations d'antiviraux à action directe, actuellement en essais cliniques, et qui en combinaison pourront permettre d'éliminer l'IFN des traitements. Enfin, d'autres composés sont en cours de développement comme des modulateurs de la réponse immunitaire, de la physiologie cellulaire, ou de l'entrée virale, qui pourrait permettre l'obtention d'une thérapie n'induisant pas de phénomène de résistance (Figure 10).



**Figure 10.** Etapes virales ciblées pour le développement de nouveaux antiviraux.

Les différents antiviraux en développement et leurs cibles sont présentés sur cette figure. Les différents composants moléculaires intervenant dans le cycle viral du HCV seront détaillés ci-après. De nombreux antiviraux à action directe, inhibant les protéines virales non structurales sont actuellement en essais cliniques. De nombreuses autres stratégies antivirales moins spécifiques ciblant des cofacteurs indispensables à l'entrée, la réplication ou l'assemblage des particules commencent à être utilisées. CBP = Protéine de liaison aux glucides ; LNA = Acide nucléique verrouillé anti-sens ; CsA = Cyclosporine A ; CypA = Cyclophiline A ; NI, NNI = inhibiteurs nucléotidiques, non nucléotidiques ; LD = gouttelettes lipidiques. (Extrait de Pawlowsky et al., 2010)

### **1.5.4 Stratégies vaccinales**

La lutte contre HCV est handicapée par l'absence de vaccin, surtout dans les pays en voie de développement où le coût des traitements antiviraux ne peut pas être supporté. En effet, un traitement pegIFN- $\alpha$  / ribavirine d'une durée standard de 2 ans coûte à lui seul plus de 6 000 euros en Angleterre, sans compter les frais médicaux d'hospitalisation, l'injection du traitement, le suivi du patient, etc. (Martin et al., 2012). Le développement d'un vaccin efficace pourrait donc réduire considérablement l'impact du HCV sur la santé publique, qu'il soit utilisé en prophylaxie ou en thérapie, en combinaison avec les traitements actuellement disponibles. Depuis la découverte du HCV, de nombreuses tentatives de mise au point d'un vaccin ont été entreprises, mais ont souffert du manque de modèles animaux. Les nombreuses approches vaccinales utilisées actuellement ont été détaillées par Joseph Torresi et collaborateurs (Torresi et al., 2011), mais aucune d'entre elles n'est encore parvenue à des essais cliniques de phase III par manque d'efficacité ou toxicité trop importante. Ces échecs peuvent notamment s'expliquer par la complexité de la réponse immunitaire anti-HCV et des stratégies d'échappement adoptées par le virus, comme celles décrites ci-dessus.

## **2 Biologie moléculaire du virus de l'hépatite C**

### **2.1 Structure et organisation du génome**

#### **2.1.1 Structure et variabilité du génome**

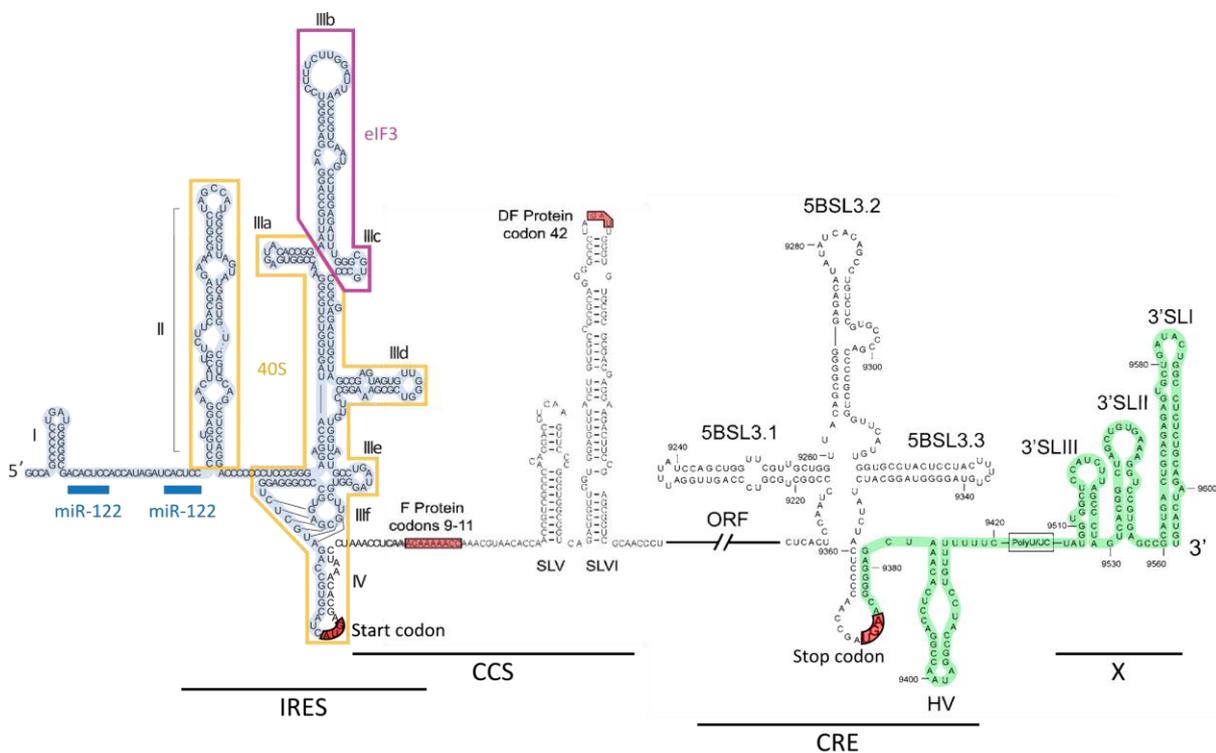
Le génome du HCV est un ARN monocaténaire de polarité positive d'approximativement 9,6 kilobases (Choo et al., 1991). Son cadre de lecture ouvert (ORF) majeur est délimité de part et d'autre par deux régions non traduites, nommées respectivement région 5' et 3' non codante (NCR) (Choo et al., 1991; Moradpour et al., 2007). Cet ORF code pour une polyprotéine de 3010 acides aminés, synthétisée et maturée au niveau du réticulum endoplasmique pour donner naissance à 10 protéines virales distinctes (Figure 12). Une protéine accessoire supplémentaire (ARFP pour Alternative Reading Frame Protein) est également synthétisée suite à un décalage du cadre de lecture (Figure 11) (Vassilaki and Mavromara, 2009). Les régions non codantes, présentant de nombreuses structures secondaires, sont indispensables à la stabilité, la réplication et la traduction du génome (Moradpour et al., 2007).

#### **2.1.2 Les régions non codantes**

##### **2.1.2.1 La région 5' non codante**

La région 5' non codante (5'-NCR) assure la traduction de l'ORF en une polyprotéine de 3010 acides aminés. Cette séquence comprenant les 341 premiers nucléotides du génome viral est très conservée parmi les différents génotypes (Bukh et al., 1992). Elle est composée de 4 grands domaines très structurés (I à IV) qui jouent un rôle essentiel dans la traduction du HCV (Figure 11) (Rijnbrand et al., 1995). Les domaines II, III et IV (nucléotides 44 à 341) ainsi que le début de la séquence de l'ORF forment en effet un site interne d'entrée des ribosomes (IRES) permettant le recrutement des sous-unités 40S et 60S du ribosome et du facteur d'initiation de la traduction eIF3 (Buratti et al., 1998; Fraser and Doudna, 2007). L'ARN viral ne possédant pas de coiffe (cap) en 5' à la différence des ARN messagers (ARNm) cellulaires, la présence d'un IRES est indispensable au recrutement des ribosomes permettant ainsi la traduction cap-indépendante du génome viral. Il

semblerait que la séquence en amont de l'IRES (domaine I) ainsi que le domaine II de l'IRES soient essentiels à une synthèse efficace du brin de polarité positive à partir du brin négatif lors de la réplication de l'ARN viral (Friebe et al., 2001). De plus, cette séquence possède deux sites de liaison à un micro-ARN spécifique du foie, miR-122 (Figure 11). Celui-ci est présent en abondance dans les hépatocytes, où il est le micro-ARN le plus fréquent (70%), et il joue un rôle important en physiologie hépatique, permettant notamment de réguler le métabolisme du cholestérol et jouant potentiellement un rôle suppresseur de tumeur (Girard et al., 2008; Lewis and Jopling, 2010). La liaison de miR-122 au génome HCV permet de faciliter la réplication de l'ARN viral (Jopling et al., 2005) et joue un rôle critique *in vitro* (Jopling et al., 2008) comme *in vivo* chez le chimpanzé (Lanford et al., 2010). En effet, l'utilisation d'un acide nucléique verrouillé (LNA) anti-miR122 chez le chimpanzé a permis d'établir la preuve de concept d'une potentielle utilisation thérapeutique de cette interaction entre miR-122 et le génome viral (Lanford et al., 2010).



**Figure 11.** Structures secondaires de l'ARN génomique du HCV.

L'ARN viral possède de nombreuses régions très structurées, que ce soit au niveau du 5'-NCR (surligné en bleu), du 3'-NCR (surligné en vert) ou de la région codante. Dans le 5'-NCR, on distingue l'IRES avec ses domaines d'interaction avec la sous-unité 40S du ribosome (encadré en jaune) et avec le facteur d'initiation eIF3 (encadré en violet). Cette région possède aussi 2 domaines de liaison à miR-122 (indiquées en bleu). Le 3'-NCR possède quant à lui une région hypervariable (HV) ainsi que le domaine X composé de ses 3 structures tige-boucle (SL). La région codante comprend 2 régions structurées : le début de la séquence codante de core (CCS) qui possède 2 régions surlignées en rouge et impliquées dans la formation des protéines F (Frameshift) et DF (Dual Frameshift) ; et l'élément cis-régulateur (CRE) à la fin de la séquence codante de NS5B, comprenant 3 structures de type tige-boucle (5BSL). (Adapté de Fraser and Doudna, 2007; McMullan et al., 2007; Romero-López and Berzal-Herranz, 2012)

### 2.1.2.2 La région 3' non codante

La région 3' non codante (3'-NCR) est localisée après le codon stop terminant l'ORF. Elle est constituée de trois régions distinctes successives : une région variable peu conservée de 30 nucléotides, une région poly(U/UC) d'une longueur moyenne de 80 nucléotides et une région terminale très conservée de 98 nucléotides, nommée région X (Figure 11) (Kolykhalov et al., 1996). Cette dernière région très conservée et structurée en trois tiges-boucles (SL1, SL2 et SL3) (Tanaka et al., 1996) joue un rôle essentiel dans la réplication de l'ARN viral *in vitro* (Friebe and Bartenschlager, 2002; Yi and Lemon, 2003) comme *in vivo* (Yanagi et al., 1999).

### 2.1.2.3 Les autres structures de l'ARN viral

En dehors des régions non codantes, d'autres régions du génome présentent des structures secondaires (Figure 11). Récemment, un élément structuré fonctionnel a été identifié en aval de l'IRES, dans la séquence codante de la protéine core, mais sa fonction reste encore méconnue (McMullan et al., 2007). Enfin, une structure ARN complexe a également été identifiée dans la séquence qui code pour la région C-terminale de la protéine NS5B (You et al., 2004). Cette région désignée 5BSL3 est composée de trois structures de type tige-boucle, donc la seconde (5BSL3.2) est capable d'interagir avec la tige-boucle SL2 du 3'-NCR (Friebe et al., 2005) ou avec le domaine III de l'IRES dans le 5'-NCR (Romero-López and Berzal-Herranz, 2009), formant ainsi des structures appelées pseudo-nœuds. Cette structure 5BSL3.2 et ses interactions avec les 5' et 3'-NCR sont indispensables à la réplication de l'ARN viral et souligne la complexité des mécanismes mis en jeu (Romero-López and Berzal-Herranz, 2012).

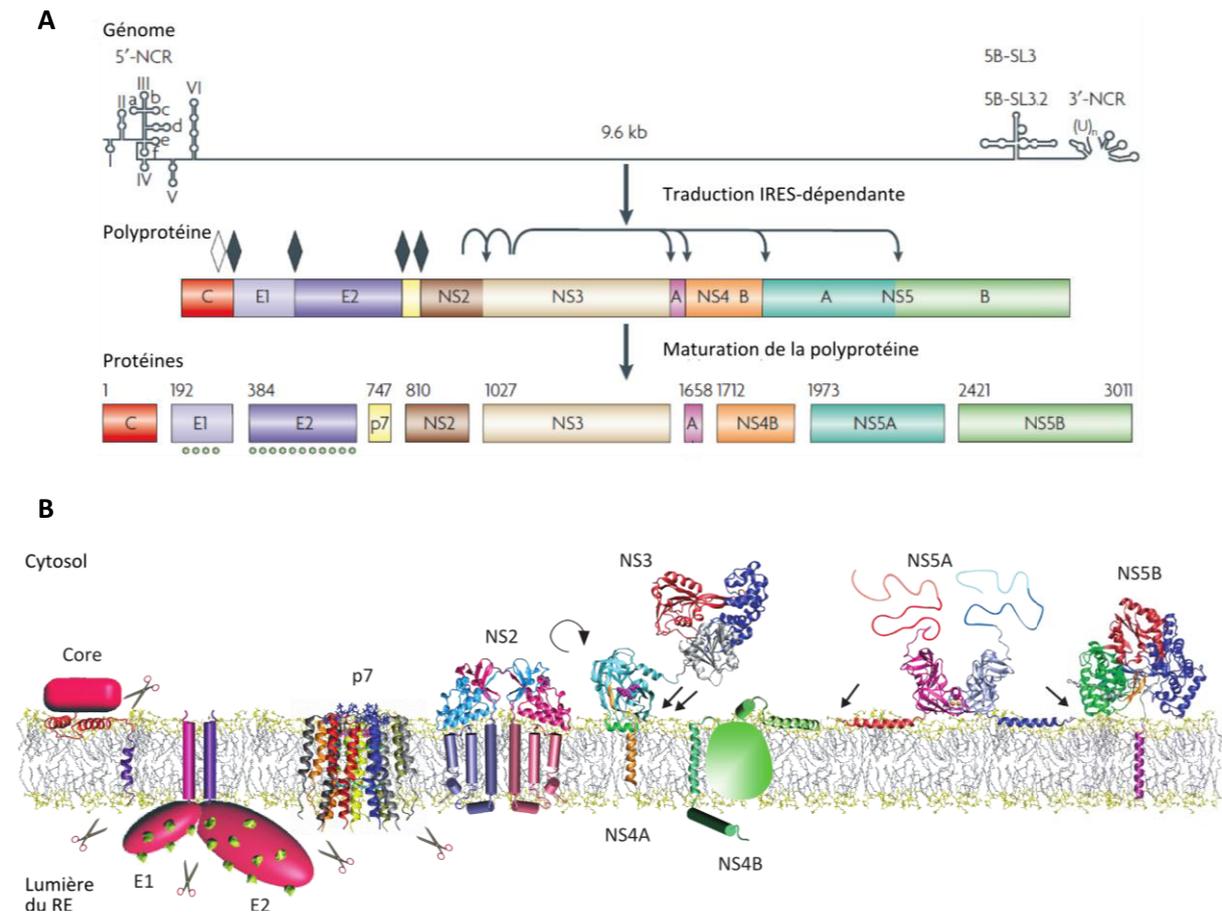
## 2.1.3 Les régions codantes

La traduction cap-indépendante du génome viral donne naissance à une polyprotéine virale d'environ 3010 acides aminés, étroitement associée à la membrane du réticulum endoplasmique (RE). Cette polyprotéine subit une maturation conduisant à l'individualisation de 10 protéines virales (Figure 12), classiquement séparées en 2 groupes : d'une part les protéines structurales core, gpE1 et gpE2 qui entrent dans la composition des virions synthétisés ; d'autre part les protéines non structurales NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B qui ne font pas partie des virions mais sont indispensables à la réplication virale, à l'assemblage et à la maturation des particules virales. La protéine p7 a longtemps été considérée comme accessoire et classée à part car elle n'est pas indispensable à la réplication *in vitro*. Les protéines structurales et p7 sont individualisées par action de la signal peptidase du RE alors que les protéines non structurales sont individualisées par action des protéases virales NS2/3 et NS3/4A (Figure 12). Cette maturation de la polyprotéine s'effectue de manière co- et post-traductionnelle, permettant aux protéines virales d'adopter alors leur structure et leur conformation finale, toujours en étroite association avec le RE. Nous allons détailler dans les paragraphes qui suivent la structure ainsi que les fonctions principales de ces différentes protéines.

### 2.1.3.1 La protéine de capsid core

La première protéine codée par le génome du HCV est la protéine de capsid core. Elle est capable de lier et de protéger l'ARN viral pour former la nucléocapsid, le cœur de la particule virale. C'est une protéine fortement basique et très conservée parmi les différents génotypes (Bukh et al., 1994). La protéine core est retrouvée sous plusieurs formes : la forme immature p23 (23 kDa, 191 aa) qui résulte du clivage de la polyprotéine par la signal peptidase, la forme mature p21 (21 kDa, 177 aa) qui résulte du clivage de p23 par la signal peptide peptidase (SPP) supprimant son domaine C-terminal fortement hydrophobe (Figure 13), mais aussi une forme minoritaire avec une partie

C-terminale tronquée (p16, environ 151 aa) qui est retrouvée dans le noyau des cellules transfectées ou des hépatocytes de patients présentant un HCC (Moriishi et al., 2003; Shirakura et al., 2007).



**Figure 12.** Organisation du génome, synthèse, maturation et structure des protéines virales.

(A) Le génome du HCV est traduit en une polyprotéine virale qui subit une maturation par clivage permettant l'individualisation des différentes protéines virales. 4 protéases interviennent dans ce processus : la signal peptidase (losanges pleins), la signal peptide peptidase (losange vide), la protéase virale NS2/3 (clivage de la jonction NS2-NS3) et la protéase virale NS3/4A (4 clivages). Les sites de glycosylation des protéines d'enveloppe gpE1 et gpE2 sont indiqués par des ronds verts. (Extrait de Moradpour et al., 2007)

(B) Disposition et structure des différentes protéines virales. Les structures cristallographiques connues sont représentées. Les sites de clivage sont représentés par des ciseaux (protéases cellulaires) ou par des flèches (protéases virales). (Document aimablement fourni par F. Penin)

La protéine core immature (p23) est composée de 3 domaines distincts (Figure 13) (Hope and McLauchlan, 2000). Le domaine 1 est fortement basique et possède un domaine de liaison à l'ARN ainsi qu'un domaine d'interactions homotypiques responsable de la multimérisation de la protéine (Blanchard et al., 2003; Ai et al., 2009), permettant la formation de la nucléocapside virale. Le domaine 2 est un domaine hydrophobe, structuré en deux hélices  $\alpha$  séparées par une courte boucle hydrophobe, responsable de la localisation de la protéine au niveau de la membrane du RE et des gouttelettes lipidiques (LD) (Hope and McLauchlan, 2000; Boulant et al., 2006). Ce domaine central joue un rôle essentiel puisqu'il permet à la fois le repliement correct de la protéine, mais aussi l'assemblage de particules virales infectieuses (cf. §4.4). Enfin, le domaine 3 est une séquence signal

qui permet la translocation de la protéine gpE1 dans la membrane du RE au cours de sa synthèse. Ce domaine C-terminal est clivé suite à l'action de la SPP et ne fait ainsi plus partie de la protéine core mature (p21). L'action de la SPP et la maturation de la protéine core sont indispensables à l'assemblage des particules virales infectieuses (Targett-Adams et al., 2008). La protéine core possède également une région d'interaction avec la tubuline, située vraisemblablement dans le domaine 1, qui jouerait un rôle dans le transport de la nucléocapside pendant le processus d'entrée et/ou d'assemblage, mais également dans le transport des LD décorées par la protéine core (Boulant et al., 2008; Roohvand et al., 2009). Enfin, cette protéine virale possède plusieurs signaux de localisation nucléaire (NLS) dans le domaine 1 ainsi qu'un signal d'export nucléaire (NES) fonctionnel dans le domaine 2 qui suggère l'existence d'un transport nucléo-cytoplasmique actif (Cerutti et al., 2011). Ceci pourrait expliquer, entre autres, de nombreux rôles de la protéine core que nous détaillerons plus tard (cf. §3.3), comme la régulation de l'expression de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme glucidique, lipidique, l'apoptose et la prolifération cellulaire. Cette protéine virale possède une stabilité très variable, qui est régulée par l'action du protéasome. Deux voies de dégradation différentes existent et sont interdépendantes. La protéine core peut être dégradée dans le noyau par l'activateur du protéasome PA28 $\gamma$  (Moriishi et al., 2003) ou dans le cytoplasme via l'intervention de l'E3 ubiquitine ligase E6AP (Shirakura et al., 2007). La dégradation de la fraction nucléaire de la protéine core par PA28 $\gamma$  pourrait inhiber sa dégradation cytoplasmique via E6AP et ainsi promouvoir la propagation virale, mais également participer à l'activité transcriptionnelle de cette protéine virale multifonctionnelle (Moriishi et al., 2010).

#### 2.1.3.2 Les glycoprotéines d'enveloppe gpE1 et gpE2

Les deux glycoprotéines gpE1 (31-35 kDa, 192 aa) et gpE2 (70-72 kDa, 363 aa) sont les constituants majeurs de l'enveloppe virale. Elles résultent du clivage de la polyprotéine virale par la signal peptidase cellulaire. Ces protéines possèdent un court domaine transmembranaire carboxy-terminal permettant leur localisation membranaire et la formation d'hétérodimères gpE1E2, nécessaires à l'assemblage et à la sécrétion des virions, ainsi qu'à la fonctionnalité des glycoprotéines d'enveloppe au cours de l'entrée virale (Cocquerel et al., 2000; Op De Beeck et al., 2000; Lavie et al., 2007). gpE1 et gpE2 possèdent également un grand ectodomaine responsable de leurs fonctions au cours de l'entrée, à savoir, la liaison aux récepteurs cellulaires et la fusion des membranes virale et cellulaire après endocytose des particules virales (Bartosch et al., 2003), comme nous le détaillerons ultérieurement (cf. §2.2.1). Ce sont des protéines fortement glycosylées qui comportent respectivement 4 et 11 sites de N-glycosylation actifs possédant des rôles dans la sécrétion virale, l'entrée virale et/ou la protection contre la neutralisation par les anticorps du patient (Goffard et al., 2005; Helle et al., 2010) (Figure 13). La protéine gpE2 comporte également 3 régions très variables situées dans son ectodomaine, les régions hypervariables 1 et 2 (HVR1 et 2) et la région variable inter-génotypique (IgVR). La région HVR1 notamment a été impliquée dans l'échappement du virus à la réponse immunitaire de l'hôte (von Hahn et al., 2007), même si la conservation de sa conformation et de ses propriétés physico-chimiques suggère un rôle important de cette région dans l'entrée virale (Penin et al., 2001).

#### 2.1.3.3 Le canal ionique p7

La protéine p7 est une petite protéine hydrophobe (7 kDa, 63 aa) comprenant deux domaines transmembranaires organisés en hélices  $\alpha$  et connectés par une boucle cytosolique hydrophile. Même si cette protéine est dispensable à la réplication de l'ARN viral *in vitro*, elle est par contre indispensable à l'infection *in vivo* (Sakai et al., 2003; Khaliq et al., 2011) et participe probablement à

l'assemblage des particules virales infectieuses via une interaction avec la protéine NS2 (Jirasko et al., 2010; Boson et al., 2011; Popescu et al., 2011). De plus, la protéine p7 est capable d'oligomérisation, formant dans la membrane du RE des hexamères (Luik et al., 2009; Montserret et al., 2010) possédant toutes les caractéristiques de canaux ioniques. Cette protéine virale est ainsi capable de réguler le pH de certains compartiments intracellulaires, probablement grâce à une perméabilité aux protons, empêchant leur acidification et protégeant les virions néoformés, sensibles au pH (Wozniak et al., 2010). Il a été également suggéré que la protéine p7, à l'instar d'autres viroporines virales, aurait une activité de canal calcique permettant l'efflux d'ions  $Ca^{2+}$  hors du réticulum, et favorisant ainsi l'assemblage viral (Griffin et al., 2003).

#### 2.1.3.4 La protéine NS2

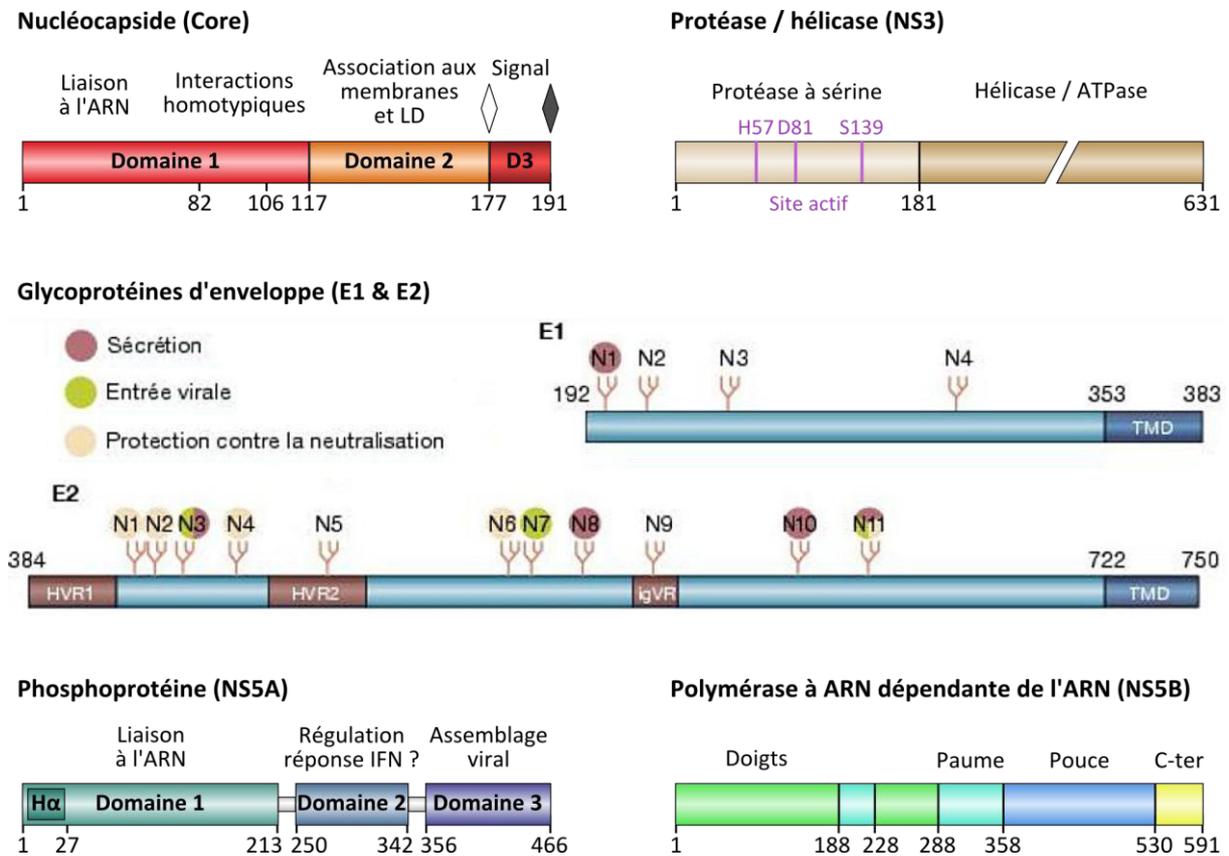
La protéine NS2 est une protéine transmembranaire (21-23 kDa, 217 aa) qui forme, avec la partie N-terminale de NS3, une autoprotéase permettant le clivage de la jonction entre NS2 et NS3 (Grakoui et al., 1993). L'homodimérisation de cette protéine semble nécessaire à son activité protéase (Lorenz et al., 2006) et au cycle de réplication du HCV (Gorzin et al., 2012). Même si la protéine NS2 n'est pas essentielle à la formation du complexe de réplication *in vitro*, dans le contexte des réplicons subgénomiques (Blight et al., 2000), elle est impliquée dans la formation des particules infectieuses et aurait un rôle central au cours de la morphogénèse virale (Jones et al., 2007; Jirasko et al., 2008, 2010; Boson et al., 2011; Ma et al., 2011; Popescu et al., 2011). Nous détaillerons le rôle de la protéine NS2 au cours de l'assemblage des particules virales infectieuses dans une section ultérieure (cf. §4.4). De manière surprenante, la cyclophiline A, qui semble faire partie du complexe de réplication de l'ARN viral et augmenter son efficacité (cf. §2.2.3), interviendrait également sur l'activité protéase de NS2 et serait ainsi essentielle à l'établissement d'un cycle viral productif (Ciesek et al., 2009; Kaul et al., 2009). Au delà de son activité protéasique, la protéine NS2 aurait d'autres fonctions potentielles, dont une inhibition de l'apoptose, mais qui n'ont, la plupart du temps, pas été confirmées par plusieurs groupes (Welbourn and Pause, 2007).

#### 2.1.3.5 La protéase à sérine et hélicase NS3 et son cofacteur NS4A

La protéine NS3 (70 kDa, 631 aa) possède une double activité enzymatique. Elle porte au niveau de son domaine N-terminal une fonction sérine protéase alors que sa partie C-terminale localise une activité NTPase et ARN hélicase (Figure 13). La protéine NS4A est un cofacteur essentiel à la fonction protéase de NS3, responsable notamment de l'association du complexe NS3/4A à la membrane du RE (Wölk et al., 2000). La protéase NS3/4A joue un rôle essentiel dans le cycle viral du HCV puisqu'elle permet l'individualisation des protéines non structurales virales en clivant la polyprotéine virale entre NS3 et NS4A puis entre NS4A, NS4B, NS5A et NS5B. De plus, comme nous l'avons décrit précédemment, la protéase NS3/4A permet l'échappement viral à la réponse immunitaire innée intracellulaire en clivant deux protéines appartenant à la voie de signalisation des ARN double brin : TRIF (Li et al., 2005) et IPS-1 (Meylan et al., 2005; Sumpter et al., 2005; Saito et al., 2008).

Le second domaine fonctionnel de la protéine NS3 possède une activité hélicase nécessaire à la réplication de l'ARN viral. Cette hélicase permet de dérouler les ARN bicaténares ou les ARN monocaténares très structurés comme l'ARN génomique du HCV grâce à son activité ATPase. Son activité est elle aussi nécessaire à la réplication du HCV. Le rôle de la présence des deux activités enzymatiques (protéase et hélicase) sur la même protéine est encore mal déterminé, cependant, une interdépendance des activités protéase et hélicase a été démontrée à plusieurs reprises, suggérant

leur interrelation spatiale et/ou fonctionnelle (Dahl et al., 2007; Beran and Pyle, 2008). Ainsi, l'importance du complexe NS3/4A dans la réplication virale et sa très bonne caractérisation structurale et fonctionnelle en font une cible privilégiée pour le développement d'antiviraux à action directe (Raney et al., 2010).



**Figure 13.** Domaines structuraux et fonctions de quelques protéines virales.

Les losanges plein et vide indiquent respectivement les sites de clivage de la protéine core par la SP et la SPP cellulaires au cours de sa maturation. TMD = Domaine transmembranaire ; Nx = Site de N-glycosylation n°x ; HVR = région hypervariable ; IgVR = région variable inter-génotypique ; H $\alpha$  = hélice  $\alpha$  ; IFN = interféron.

Par ailleurs, des données éparses suggèrent un rôle de la protéine NS3 dans l'oncogenèse virale induite, notamment via une interaction avec le suppresseur de tumeur p53, mais ces résultats restent à confirmer (Levrero, 2006). Enfin, plus récemment, un rôle de la protéine NS3 au cours de l'assemblage viral a été suggéré, via une interaction avec certaines protéines comme la protéine cellulaire de liaison à l'ARN YB-1 (Y-box binding protein 1), localisée à la surface des LD dans les cellules infectées (Chatel-Chaix et al., 2011), ou la protéine virale core (Ma et al., 2008; Jones et al., 2011), qui permettrait le recrutement des complexes de réplication au niveau des sites d'assemblage (cf. §4.4).

#### 2.1.3.6 La protéine NS4B

La protéine NS4B est une protéine membranaire hydrophobe de 261 aa (27 kDa). Elle possède des extrémités N- et C-terminales cytosoliques organisées en hélices  $\alpha$  et séparées par quatre domaines transmembranaires (Gouttenoire et al., 2010). Son rôle dans le cycle viral du HCV est

encore mal compris. Il semblerait qu'elle induise des remaniements membranaires permettant la création d'un environnement propice à la formation des complexes de réplication, le "membranous web" (Egger et al., 2002; Gosert et al., 2003). Ses multiples interactions avec les autres protéines non structurales seraient à l'origine de l'organisation et de la cohérence du complexe de réplication (Gouttenoire et al., 2010). L'interaction de la protéine NS4B avec elle-même et avec la protéine NS5A semble en effet indispensable à la formation d'un complexe de réplication fonctionnel (Paul et al., 2011). Récemment, une étude a suggéré une influence de la région C-terminale de cette protéine sur l'assemblage de particules virales infectieuses (Jones et al., 2009), sans qu'il n'y ait pour autant d'impact sur la réplication. Enfin, la protéine NS4B a également été impliquée dans la réponse UPR (Unfolded Protein Response) et le stress du réticulum (Li et al., 2009), la stéatose (Park et al., 2009), l'autophagie (Su et al., 2011) et la carcinogenèse (Gouttenoire et al., 2010). Néanmoins, de nombreux efforts sont encore nécessaires pour disséquer les fonctions de cette protéine au cours du cycle viral.

#### 2.1.3.7 La phosphoprotéine NS5A

La protéine NS5A est une phosphoprotéine qui existe sous deux formes : une forme faiblement phosphorylée (56 kDa) et une forme hyperphosphorylée (58 kDa) (Tanji et al., 1995). Cette protéine, ancrée à la membrane du RE grâce à son hélice  $\alpha$  N-terminale (Penin et al., 2004), est composée de 3 domaines séparés par des boucles peu structurées (Figure 13). La structure du domaine I a été déterminée par cristallographie, ce qui a permis de révéler la capacité d'homodimérisation de ce domaine, formant une structure de type "pince" avec une gouttière basique tournée vers le cytosol et capable de lier des ARN mono- ou bicaténaux (Figure 12) (Tellinghuisen et al., 2005). Cet homodimère présente également des surfaces très conservées d'interaction potentielle avec d'autres protéines à l'extérieur de la "pince". La présence de plusieurs homodimères de NS5A pourrait permettre la formation d'un sillon protecteur pour l'ARN viral néosynthétisé. L'hélice  $\alpha$  N-terminale de la protéine NS5A a également été identifiée comme une zone potentielle d'interaction avec d'autres protéines virales, permettant la formation du complexe de réplication (Penin et al., 2004). La protéine NS5A possède donc un rôle fondamental au cours de la réplication du génome viral que nous détaillerons plus tard (cf. §2.2.3). Le domaine II est quant à lui assez peu caractérisé en dehors d'une région de détermination de la sensibilité à l'IFN (ISDR) coïncidant avec une région de liaison à la protéine kinase activée par les ARN (PKR) (Gale et al., 1998; Toroney et al., 2010). Le domaine III par contre a été récemment impliqué dans les processus d'assemblage et de morphogenèse viraux, permettant de rapprocher les complexes de réplication des sites d'assemblage situés à proximité des LD (cf. §4.4) (Appel et al., 2008). Les domaines II et III contiennent le plus de sites de phosphorylation et l'hyperphosphorylation de la protéine aurait pour conséquence une inhibition de la réplication et une stimulation de l'assemblage. La protéine NS5A jouerait ainsi un rôle d'interrupteur moléculaire régulant, en fonction de son état de phosphorylation, la réplication et l'assemblage (Evans et al., 2004).

En dehors de ses actions directes sur le cycle viral, la protéine NS5A interagit avec de nombreuses protéines et induit ainsi d'importantes modifications de la physiologie cellulaire. Entre autres, la protéine NS5A est capable de former un complexe avec la PKR via son domaine II, inhibant son activité de répression transcriptionnelle en présence d'ARN double brin (Gale et al., 1998; Toroney et al., 2010). L'inhibition de la réponse IFN médiée par NS5A est également une conséquence d'une induction de l'expression de la cytokine IL-8 (Polyak et al., 2001). De plus, la protéine NS5A semblerait interférer avec la maturation des cellules NK en induisant une modification des profils de sécrétion cytokinique par les monocytes. Ceci conduirait à une diminution de la

sécrétion d'IFN $\gamma$  à activité antivirale, observée *ex vivo* (Sène et al., 2010) et en modèle murin (Kanda et al., 2009). Enfin, d'autres rôles de la protéine NS5A sur la physiologie cellulaire et hépatique ont été décrits récemment, comprenant notamment une augmentation de la gluconéogenèse (Deng et al., 2011), de l'accumulation intracellulaire de lipides (Kim et al., 2009), de la survie cellulaire (Peng et al., 2010a) et du stress du RE (Dionisio et al., 2009). Toutes ces altérations ont de nombreuses conséquences sur la physiopathologie de l'infection chronique par HCV comme le montre une étude récente en souris transgénique où la protéine NS5A induit une stéatose, une augmentation du stress oxydant et l'apparition de HCC chez quelques souris (Wang et al., 2009).

#### **2.1.3.8 La polymérase NS5B**

La protéine NS5B est l'ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp) responsable de la réplication de l'ARN viral. Comme toutes les RdRp, la protéine NS5B possède un motif catalytique de type Gly-Asp-Asp (GDD) et une structure tridimensionnelle analogue à celle d'une main droite, présentant 3 domaines nommés doigts, paume et pouce (Figure 13) (Bressanelli et al., 1999). Cette protéine, d'un poids moléculaire de 68 kDa, est ancrée au niveau des membranes du RE par son domaine C-terminal, indispensable à la réplication virale (Moradpour et al., 2004). Les interactions de la protéine NS5B avec d'autres protéines virales ainsi qu'avec des partenaires cellulaires et leurs rôles dans la réplication de l'ARN viral seront détaillés ci-après (cf. §2.2.3).

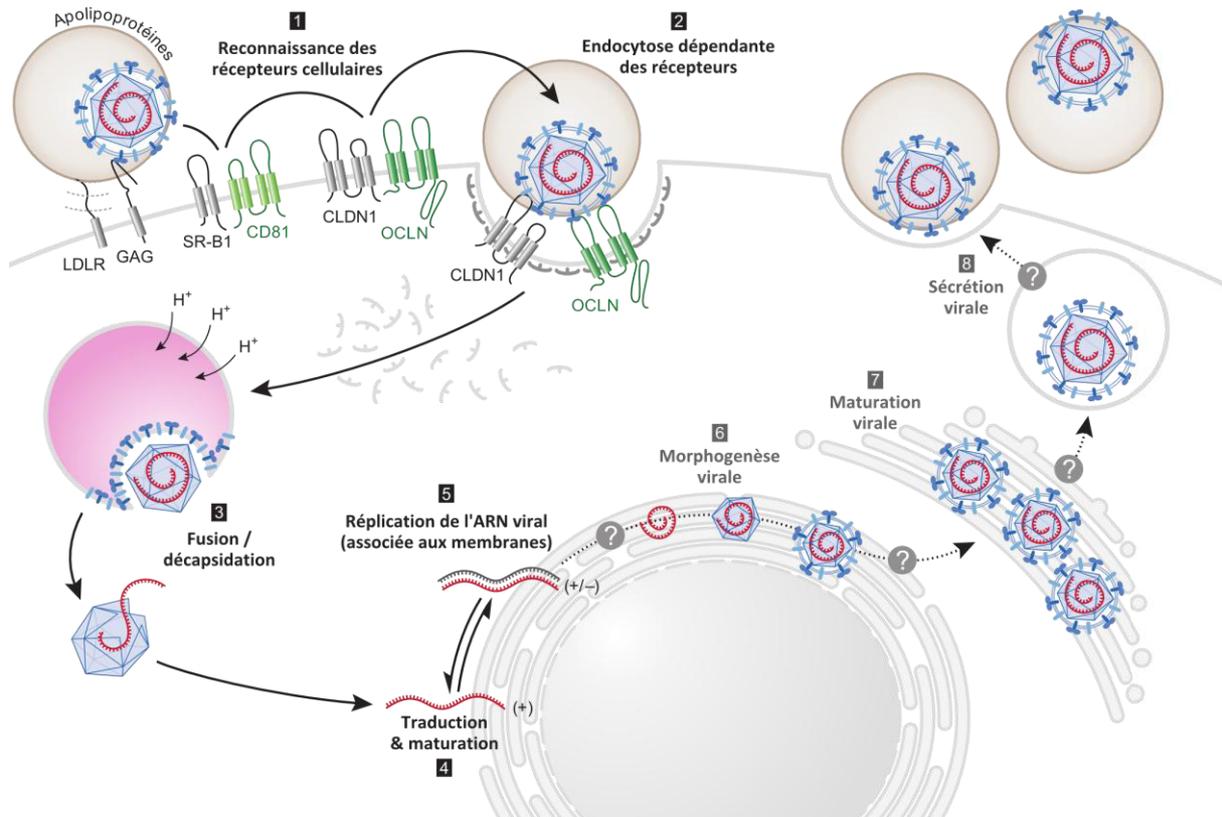
#### **2.1.3.9 Les protéines ARFP/F/core+1**

Un décalage du cadre de lecture au cours de la traduction de la polyprotéine virale peut avoir lieu, donnant naissance à des protéines accessoires alternativement dénommées ARFP (Alternative Reading Frame Protein), protéine F (Frameshift) ou protéine core+1 (Vassilaki and Mavromara, 2009). Deux séquences nucléotidiques ont majoritairement été associées avec la synthèse de ces protéines ARFP, à savoir les codons 9 à 11 présentant une séquence riche en adénosine et propice à un décalage du cadre de lecture, ainsi que le codon 42 (Figure 11) (Boulant et al., 2003; McMullan et al., 2007). Ces deux séquences sont situées au début de la région codant pour la protéine core, impliquant l'existence de séquences protéiques partagées entre la protéine core et les protéines ARFP. Ces protéines ont une durée de vie très courte *in vitro* et ne sont pas nécessaires à la réplication virale (McMullan et al., 2007). Néanmoins, la présence d'anticorps spécifiques chez les patients témoigne de leur expression *in vivo* (Vassilaki and Mavromara, 2009). Des études complémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre les fonctions biologiques de ces protéines virales alternatives peu étudiées et leurs implications potentielles en pathogenèse.

## **2.2 Biologie cellulaire de la réplication virale**

Le cycle viral du HCV est principalement hépatocytaire, même si quelques données ont été publiées, suggérant une possible réplication extra-hépatique du virus, notamment dans les cellules mononuclées du sang (PBMC) (Blackard et al., 2006; Revie and Salahuddin, 2011) et dans les entérocytes (Deforges et al., 2004; Diaz et al., 2006). Ce tropisme hépatique est vraisemblablement imputable à l'existence de plusieurs facteurs de l'hôte majoritairement exprimés dans les hépatocytes, et contribuant à chacune des étapes du cycle viral. Le cycle viral du HCV est complexe et possède un lien fort avec les lipides et leur métabolisme. Il peut être scindé en plusieurs étapes (Figure 14), à savoir, l'entrée du virus, la réplication de son génome, sa traduction, puis la morphogenèse et la sécrétion de particules virales infectieuses permettant de propager l'infection à

d'autres cellules. Nous aborderons les trois premières étapes ci-dessous, pour se concentrer sur les dernières étapes ultérieurement (cf. §4.4).



**Figure 14.** Cycle viral du virus de l'hépatite C (HCV).

Les différentes étapes du cycle viral sont présentées sur ce schéma. Après une phase d'attachement peu spécifique à la membrane de la cellule hôte, les particules virales interagissent avec les différents récepteurs du HCV (1), permettant leur endocytose spécifique dépendant de la clathrine (2), puis la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane de l'endosome précoce suite à l'acidification de ce dernier. Cette étape de fusion permet la décapsidation virale (3) et la libération du génome viral dans la cellule infectée. La traduction cap-indépendante du génome viral (4) va permettre la synthèse des diverses protéines non structurales nécessaires à la réplication du génome, en étroite association avec des membranes issues du réticulum (5), et à une traduction plus importante de celui-ci (4). Une fois les protéines structurales exprimées et l'ARN amplifié, il y a morphogenèse de nouvelles particules virales au niveau du réticulum endoplasmique (6) qui vont subir une maturation (7) avant leur sécrétion sous forme de virions infectieux (8). Les points d'interrogation soulignent les étapes du cycle viral les moins bien caractérisées. Les différents récepteurs et la signification de leurs abréviations seront présentés ultérieurement. (Adapté de Ploss and Rice, 2009)

## 2.2.1 Entrée virale

### 2.2.1.1 Mécanismes d'entrée

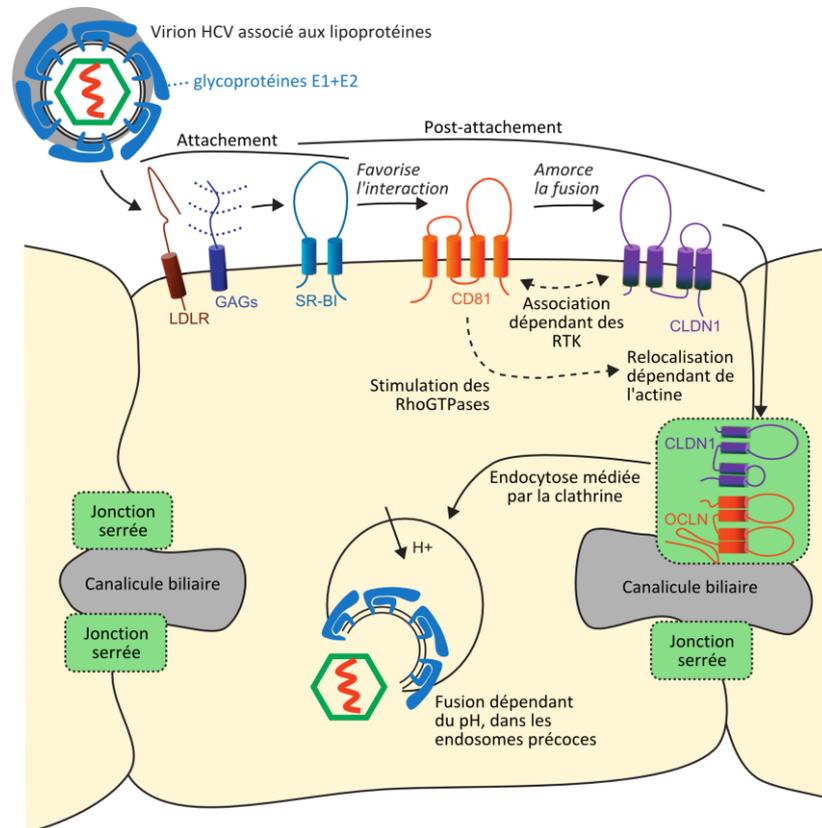
L'entrée virale du HCV est un processus complexe qui peut être scindé en plusieurs étapes : l'attachement du virus à la surface cellulaire, l'interaction avec ses récepteurs cellulaires spécifiques, une étape probable de migration vers les jonctions serrées, l'endocytose dépendant des récepteurs,

et enfin, la fusion membranaire qui a lieu dans les endosomes précoces et permet la libération de la nucléocapside virale dans le cytoplasme (Figure 15) (Lupberger et al., 2012; Ploss and Evans, 2012). Avant d'entrer en contact avec la surface des hépatocytes, les particules virales présentes dans le sang doivent franchir une première barrière, la paroi des capillaires sinusoides composées de cellules endothéliales fenêtrées. Ces cellules endothéliales sinusoides du foie (LSEC) expriment à leur surface des protéines membranaires de liaison aux sucres, appelées lectines, dont la protéine DC-SIGN (dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin) qui est capable de lier la glycoprotéine d'enveloppe virale gpE2 (Pöhlmann et al., 2003; Lai et al., 2006). Les LSEC seraient ainsi impliqués dans la capture des particules virales et leur transcytose vers les hépatocytes sous-jacents, même si aucune preuve formelle n'a été apportée pour le moment (Meredith et al., 2012).

Une fois que le virus a traversé l'endothélium et se retrouve au contact des hépatocytes, il s'attache à des récepteurs peu spécifiques que sont les glycosaminoglycanes (GAG) (Barth et al., 2003, 2006) et le récepteur aux lipoprotéines de faible densité (LDLR) (Agnello et al., 1999; Molina et al., 2007). Ceux-ci permettraient de faciliter l'attachement initial des particules virales, soit par l'intermédiaire de la glycoprotéine d'enveloppe gpE2 dans le cas de l'héparane sulfate (un GAG), soit par l'intermédiaire des lipoprotéines associées aux particules virales dans le cas du LDLR (Figure 15). Après cette étape initiale d'attachement, la particule reconnaît spécifiquement d'autres récepteurs que sont le récepteur scavenger classe B type I (SR-B1) (Scarselli et al., 2002) et la tétraspanine CD81 (Pileri et al., 1998). SR-B1 interagit de manière directe avec la protéine gpE2, au niveau de la région HVR1 (Dreux et al., 2009b), mais semble également interagir avec les lipoprotéines associées aux particules virales (Maillard et al., 2006). Les rôles de SR-B1 sont multiples au cours de l'entrée, puisqu'il régule l'attachement précoce des particules virales avant l'interaction avec CD81 (Catanese et al., 2010), permet de réguler l'interaction avec CD81 (Meredith et al., 2012) et joue également un rôle plus tardif encore mal défini, en relation avec son activité physiologique de récepteur aux lipoprotéines de forte densité (HDL) (Dreux et al., 2009b; Syder et al., 2011).

La tétraspanine CD81 est quant à elle une protéine membranaire exprimée de manière quasi-ubiquitaire et n'est donc pas responsable de l'hépatotropisme du HCV. Cette protéine est capable de former des homodimères ou des hétérodimères avec d'autres tétraspanines, créant ainsi des réseaux membranaires structurés de tétraspanines, les "tétraspanine webs", ayant un rôle dans de nombreux processus cellulaires incluant l'adhésion, la migration et la signalisation (Boucheix and Rubinstein, 2001; Charrin et al., 2009). CD81 est un récepteur majeur du HCV possédant une forte affinité pour la glycoprotéine d'enveloppe gpE2. La délétion de la région HVR1 de gpE2 entraîne un changement de conformation qui augmente l'affinité de la glycoprotéine pour CD81. Il a été ainsi suggéré que l'interaction de gpE2 avec SR-B1 pourrait également induire un changement conformationnel apprêtant gpE2 pour son interaction avec CD81 (Farquhar et al., 2011). Un des nombreux partenaires de CD81 au sein des "tétraspanine webs" est la tétraspanine EWI-2 qui permet ces réseaux membranaires au cytosquelette d'actine (Sala-Valdés et al., 2006) et qui possède un rôle dans l'entrée virale puisque son produit de clivage, EWI-2wint, absent des hépatocytes mais présent dans de nombreuses lignées non permissives, permet une inhibition efficace de l'entrée virale via son interaction avec CD81 (Levy et al., 2008; Montpellier et al., 2011). Le second partenaire de CD81 requis pour l'entrée des particules virales est la protéine Claudine-1 (CLDN-1), une protéine des jonctions serrées fortement exprimée dans le foie (Evans et al., 2007; Bonander et al., 2011). Bien que CLDN-1 soit impliquée dans la formation et la structure des jonctions serrées, à proximité du

pôle apical de la cellule, les molécules de CLDN-1 impliquées dans l'entrée du virus sont localisées au niveau de la membrane basolatérale (Harris et al., 2010). L'interaction entre ces deux récepteurs est requise pour l'entrée des particules virales (Harris et al., 2010; Krieger et al., 2010; Farquhar et al., 2012).



**Figure 15.** Entrée du HCV dans la cellule hôte.

L'entrée se décompose en plusieurs étapes : une première étape d'attachement peu spécifique via le récepteur aux LDL (LDLR) et les glycosaminoglycanes (GAG) ; une seconde étape d'interaction avec le récepteur scavenger classe B type I (SR-BI), la tétraspanine CD81 et la protéine de jonction serrée claudin-1 (CLDN1) ; une étape probable de migration des complexes virus/récepteurs (CD81+CLDN1) vers les jonctions serrées où le dernier récepteur, l'occludine (OCLN) va permettre une endocytose dépendante de la clathrine de la particule virale. Finalement, l'acidification des endosomes précoces va permettre la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane de l'endosome et la libération de la nucléocapside dans le cytoplasme. RTK = Récepteurs Tyrosine Kinase. (Extrait de Ploss and Evans, 2012)

La fixation de la glycoprotéine virale gpE2 à son récepteur CD81 est capable d'activer les Rho-GTPases cellulaires et d'induire un réarrangement du cytosquelette d'actine (Brazzoli et al., 2008). Par analogie avec le processus d'entrée du virus Coxsackie B dans des cellules épithéliales fortement polarisées, il a été suggéré que cette réorganisation du cytosquelette d'actine pourrait avoir pour conséquence une relocalisation des complexes virus-CD81-CLDN-1 et leur migration depuis la membrane basolatérale jusqu'aux jonctions serrées (Figure 15) (Brazzoli et al., 2008). En effet, le dernier récepteur du HCV récemment identifié et encore mal caractérisé, l'occludine (OCLN) (Ploss et al., 2009), est un composant essentiel des jonctions serrées, présent exclusivement au niveau de la

membrane apicale des hépatocytes polarisés. L'occludine est impliquée dans l'entrée virale après l'attachement du virus (Benedicto et al., 2009) voire au cours de la fusion dans les endosomes précoces (Meredith et al., 2012). C'est le dernier récepteur permettant de restreindre l'infection aux hépatocytes humains, puisque la surexpression de tous ces récepteurs viraux humains dans des hépatocytes murins permet de les rendre totalement permissifs pour l'entrée virale (Ploss et al., 2009). Seules les versions humaines de CD81 et OCLN sont indispensables à l'entrée dans des cellules murines, les versions murines de SR-BI et CLDN-1 permettant tout de même l'entrée virale.

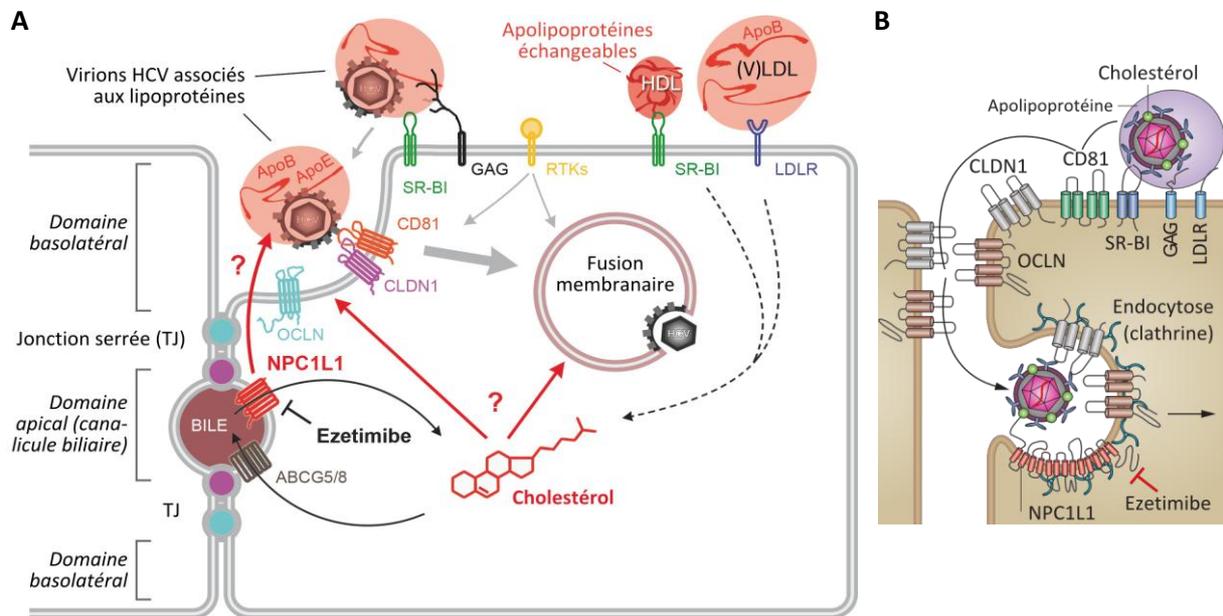
HCV pénètre alors dans la cellule par endocytose médiée par les récepteurs viraux et dépendant de la clathrine (Figure 15) (Blanchard et al., 2006). Une fois internalisée, la particule virale est dirigée vers les endosomes précoces (Meertens et al., 2006) où se produit la fusion membranaire entre l'enveloppe virale et la membrane de l'endosome. Cette fusion dépendante du pH est déclenchée par l'acidification de l'endosome précoce, entraînant un réarrangement des hétérodimères gpE1E2 qui conduit à la formation d'un pore de fusion (Lavillette et al., 2006). Ce processus de fusion membranaire dépend de la protéine E2, de la composition lipidique des membranes virales et cellulaires et de la densité des particules virales (Haid et al., 2009). Le récepteur CD81 semblerait également jouer un rôle important dans l'amorçage de l'activité fusogène de gpE2 puisque certains mutants de CD81 permettent une fusion précoce à la membrane cellulaire (Bitzegeio et al., 2010). Une fois la fusion effectuée, la nucléocapside virale est relâchée dans le cytoplasme, permettant d'initier la traduction puis la réplication du génome viral.

#### **2.2.1.2 Rôle des lipides et des facteurs de croissance**

Comme nous l'avons déjà décrit, le virus de l'hépatite C possède un lien fort avec le métabolisme lipidique de l'hôte. Une illustration moléculaire de cette association peut être apportée au cours de l'entrée virale. En effet, l'entrée du HCV est notamment modulée par les lipoprotéines de l'hôte. Le corécepteur SR-BI est en effet un récepteur physiologique pour les HDL (Steinberg, 1996). Il est impliqué dans l'assimilation des esters de cholestérols provenant des HDL et dans l'efflux de cholestérol vers les HDL (Fidge, 1999). L'incubation des cellules avec des HDL permet d'augmenter l'entrée virale via SR-BI (Dreux et al., 2006). De plus, les LDL oxydées, également capables d'interagir avec le récepteur SR-BI, sont quant à elles responsables d'une inhibition de l'entrée virale (von Hahn et al., 2006), même si leur mécanisme d'action reste méconnu. SR-BI fait ainsi le lien entre l'entrée virale, les lipoprotéines et le cholestérol. Récemment, un nouveau cofacteur impliqué dans l'entrée virale a été identifié. Il s'agit du récepteur d'absorption du cholestérol Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1) (Sainz et al., 2012a). Ce transporteur membranaire est localisé au pôle apical des hépatocytes, au niveau des canalicules biliaires, où il est responsable de l'absorption du cholestérol présent dans la bile. Son activité d'absorption du cholestérol semble indispensable à l'entrée virale, même s'il pourrait également jouer un rôle plus direct dans ce processus (Figure 16). Ce nouveau facteur représente une excellente cible thérapeutique étant donné qu'un inhibiteur de son activité, l'ezetimibe, est déjà disponible et utilisé chez les patients (Sainz et al., 2012a). Ainsi, le cholestérol, pouvant être absorbé par NPC1L1, SR-BI ou via le récepteur aux LDL, jouerait un rôle fondamental pour le virus en entrant dans la composition de domaines membranaires spécifiques nécessaires à l'interaction entre CD81 et CLDN-1, mais aussi au processus de fusion au sein des endosomes (Figure 16) (Lupberger et al., 2012).

Enfin, il a été montré récemment que le récepteur au facteur de croissance épidermique (EGFR) ainsi que d'autres récepteurs tyrosine kinase (RTK) sont également impliqués dans l'entrée du HCV (Lupberger et al., 2011). En effet, une stimulation d'EGFR à l'aide de son ligand EGF permet

d'augmenter significativement l'entrée tandis que l'inhibition de son activité tyrosine kinase affecte l'entrée. Tout comme pour le cholestérol, cette inhibition serait en relation avec une perturbation de la formation des complexes CD81-CLDN-1 et de la fusion membranaire (Lupberger et al., 2011). Les voies de signalisation impliquées ainsi que les mécanismes moléculaires de l'action des RTK sur l'entrée virale restent à élucider.



**Figure 16.** Influence du métabolisme lipidique et du cholestérol sur l'entrée du HCV.

(A) La fonction physiologique des récepteurs SR-BI et LDLR permet de réguler la quantité intracellulaire de cholestérol. Leur affinité pour les lipoprotéines en fait potentiellement des récepteurs viraux capables de reconnaître la composante apolipoprotéique des particules virales. Le nouveau facteur d'entrée NPC1L1 (Niemann-Pick C1-Like 1) est un récepteur d'absorption du cholestérol situé sur la membrane apicale (au niveau des canalicules biliaires) et participe donc également à la régulation du cholestérol intracellulaire. Le cholestérol semblerait nécessaire à l'entrée virale, probablement via une modulation de l'organisation membranaire permettant la formation des complexes de récepteurs nécessaires à l'entrée virale, ou via une facilitation de la fusion membranaire. Les récepteurs tyrosine kinase (RTK) tels que le récepteur à l'EGF joueraient un rôle similaire. (Extrait de Lupberger et al., 2012)

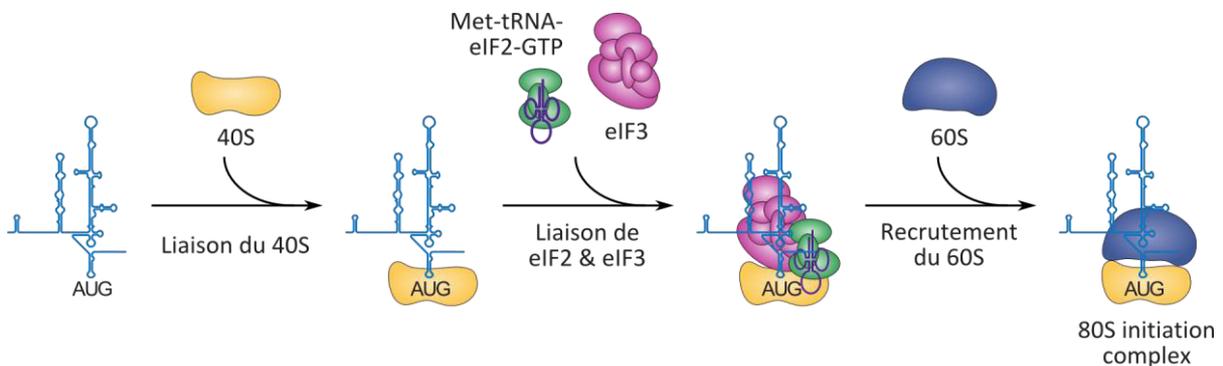
(B) Le cofacteur d'entrée NPC1L1 pourrait également avoir un rôle plus direct dans l'entrée virale à proximité des jonctions serrées et du pôle apical de la cellule. (Extrait de Ray, 2012)

### 2.2.1.3 Transmission de cellule à cellule

Récemment, un nouveau mode transmission du HCV a été décrit *in vitro*. Par opposition à une transmission classique, acellulaire, impliquant la sécrétion de virions dans le milieu de culture puis un processus d'entrée tel que décrit précédemment, HCV pourrait également être directement transmis de cellule à cellule. Cette voie de transmission encore mal caractérisée serait illustrée par la formation de foci d'infection en culture cellulaire. Elle permettrait une transmission rapide du virus, indépendante du récepteur CD81, et ainsi plus résistante aux anticorps neutralisants (Timpe et al., 2008; Witteveldt et al., 2009; Brimacombe et al., 2011).

### 2.2.2 Expression et maturation des protéines virales

Une fois libéré dans le cytoplasme, l'ARN génomique viral de polarité positive est pris en charge par la machinerie traductionnelle cellulaire de l'hôte. Contrairement aux ARN messagers cellulaires eucaryotes qui possèdent une coiffe située en 5' et composée d'une méthyl-guanosine triphosphate (nommée 5'-cap), l'ARN du HCV est traduit par un processus cap-indépendant faisant intervenir un site d'entrée interne du ribosome (IRES). Cet IRES, localisé dans la région 5'-NCR, possède une structure complexe et extrêmement conservée (cf. §2.1.2.1) qui lui permet de recruter la sous-unité 40S du ribosome ainsi que le facteur eIF3. Contrairement à la traduction cap-dépendante qui nécessite la présence de nombreux facteurs d'initiation, responsables notamment de la reconnaissance de la coiffe, la traduction cap-indépendante du génome HCV ne nécessite que le recrutement d'eIF3 et eIF2 qui apporte le premier ARN de transfert couplé à la méthionine ainsi que l'énergie nécessaire à l'incorporation du premier acide aminé de la polyprotéine (Figure 17) (Fraser and Doudna, 2007). La liaison d'eIF3 au domaine III de l'IRES semblerait induire un changement conformationnel nécessaire pour l'assemblage du ribosome (Boehringer et al., 2005).



**Figure 17.** Traduction cap-indépendante du génome viral.

L'IRES situé en 5'-NCR du génome HCV (ici en bleu) possède une conformation capable de recruter la sous-unité 40S du ribosome, puis les facteurs d'initiation de la traduction eIF3 et eIF2, ce dernier étant couplé à l'ARN de transfert méthionine (Met-tRNA) et au GTP responsables de l'apport du premier acide aminé (méthionine) de la chaîne polypeptidique. La sous-unité 60S du ribosome est alors recrutée, permettant la synthèse de la polyprotéine virale. (Extrait de Fraser and Doudna, 2007)

L'interaction de l'IRES avec les autres structures ARN présentes dans la région 3'-NCR ou dans la séquence codante joue un rôle important au cours l'initiation de la traduction. Notamment, la région 3'-NCR semble fortement stimuler la traduction IRES-dépendante, suggérant une interaction entre les extrémités 5' et 3' du génome (Song et al., 2006). De plus, la protéine de liaison à l'ARN messenger de la protéine IGF2 (IGF2BP1) qui peut interagir avec les régions 5' et 3'-NCR semble impliquée dans le recrutement d'eIF3 et l'initiation de la traduction (Weinlich et al., 2009). Enfin, il a été montré récemment que la structure ARN 5BSL3.2 présente dans la séquence codante de NS5B jouerait quant à elle un rôle inhibiteur de la traduction en interagissant directement avec l'IRES (Romero-López and Berzal-Herranz, 2012). Ces interactions ARN-ARN pourraient permettre une régulation fine de la traduction et du recrutement de protéines cellulaires en faveur de la traduction ou de la réplication.

De nombreux facteurs cellulaires sont également impliqués dans la modulation de la traduction virale. Le micro-ARN miR-122, spécifique du foie, et impliqué principalement dans la

réplication de l'ARN viral (Jopling et al., 2005, 2008), semble également jouer un rôle de stimulation de l'initiation de la traduction en augmentant le recrutement des ribosomes (Henke et al., 2008; Jangra et al., 2010). Certaines protéines cellulaires sont requises pour l'initiation de la traduction virale. C'est le cas de la protéine reconnaissant les séquences polypyrimidiques (PTB) (Ali and Siddiqui, 1995) et de l'autoantigène La qui se fixe sur l'IRES viral (Ali and Siddiqui, 1997; Ali et al., 2000). En cas de stress cellulaire et notamment suite à la reconnaissance d'ARN double brin par la PKR (cf. §1.4.1), il y a phosphorylation du facteur d'initiation eIF2 $\alpha$  qui ne peut plus former de complexe ternaire Met-tRNA-eIF2-GTP, inhibant ainsi la traduction. Cependant, HCV est insensible à l'inactivation d'eIF2 $\alpha$ . Il a été en effet récemment décrit que eIF2A, une protéine alternative de liaison à l'ARN de transfert initiateur, était capable d'interagir avec le domaine IIIId de l'IRES et d'initier la traduction virale en conditions de stress cellulaire (Kim et al., 2011a). Ce mécanisme pourrait représenter une stratégie supplémentaire d'échappement à la réponse innée cellulaire et au stress cellulaire induit par la réplication virale.

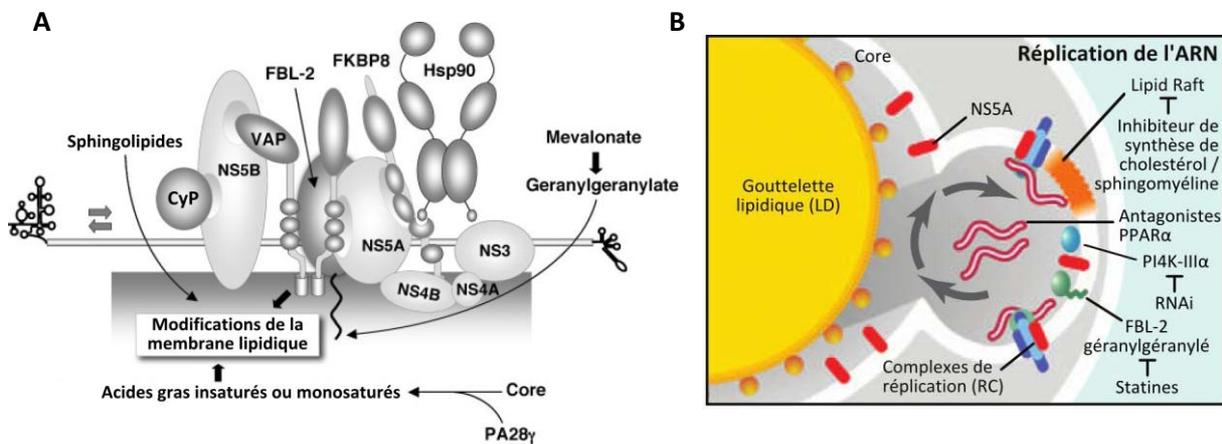
Une fois la traduction initiée, il y a synthèse de la polyprotéine virale et maturation co- et post-traductionnelle des protéines au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique, comme nous l'avons précédemment décrit.

### **2.2.3 Réplication du génome viral**

Une fois synthétisées, l'ARN polymérase ARN-dépendante (NS5B) et la plupart des autres protéines virales non structurales (NS3, NS4A, NS4B, NS5A) s'associent à des protéines cellulaires pour former le complexe de réplication. Celui-ci serait associé à des membranes dérivées du RE et présentant une structuration plus ou moins complexe. Ces réseaux membranaires, siège probable de la réplication virale, ont été baptisés "membranous web" (Egger et al., 2002; Gosert et al., 2003). La protéine NS4B jouerait un rôle crucial dans la formation de ces complexes de réplication étant donné qu'elle serait capable à elle seule d'induire les remaniements membranaires observés (Egger et al., 2002), mais aussi qu'elle pourrait interagir avec la plupart des protéines non structurales virales (Gouttenoire et al., 2010). La protéine NS4B est en effet capable d'oligomérisation grâce à sa région C-terminale, palmitoylée et très conservée, et cette oligomérisation est un pré-requis à la formation des structures membranaires complexes décrites ci-dessus et à l'établissement de complexes de réplication fonctionnels (Paul et al., 2011). On peut supposer que l'oligomérisation de NS4B pourrait induire la formation de réseaux multimériques à la surface des membranes cellulaires et entraîner leur courbure comme cela a déjà été décrit pour d'autres protéines cellulaires (Gouttenoire et al., 2010). Ces observations conduisent à établir un modèle de complexe de réplication où toutes les protéines non structurales virales (exceptés peut-être p7 et NS2) seraient regroupées, en présence de cofacteurs cellulaires et de l'ARN viral en cours de réplication, au sein de "niches" de type vésiculaires formées par la protéine NS4B et protégeant l'ARN viral néosynthétisé (Figure 18) (Quinkert et al., 2005).

De nombreuses protéines cellulaires interagissent avec les protéines virales non structurales, font partie du complexe de réplication et jouent ainsi un rôle dans la réplication de l'ARN viral (Moriishi and Matsuura, 2007). C'est notamment le cas des peptidyl-prolyl *cis/trans* isomérases FKBP8 (Okamoto et al., 2006) et cyclophilines A et B (Watashi et al., 2005; Kaul et al., 2009) qui interagissent respectivement avec NS5A et NS5B et qui activent la réplication virale (Figure 18). L'action provirale des cyclophilines A et B peut être inhibée par un immunosuppresseur, la cyclosporine A, qui a la capacité de se lier aux cyclophilines et d'empêcher leur interaction avec NS5B. Les protéines de choc thermique Hsp90 (Okamoto et al., 2006) et Hsp72 (Chen et al., 2010)

font également partie du complexe de réplication via leur interaction avec NS5A. Ces peptidyl-prolyl isomérases et Hsp pourraient être impliquées dans le repliement correct des protéines du complexe de réplication permettant ainsi une activité enzymatique efficace. Récemment, la kinase c-Src a été impliquée dans la formation du complexe protéique NS5A-NS5B nécessaire à la réplication virale (Pfannkuche et al., 2011).



**Figure 18.** Réplication du génome viral et facteurs de l'hôte associés.

(A) Modèle putatif de la structure du complexe de réplication de l'ARN viral faisant entrer en jeu des protéines virales, des protéines de l'hôte et des modifications de la membrane lipidique. CyP = cyclophilines ; VAP = Protéines de liaison aux protéines membranaires associées aux vésicules ; FBL-2 = Protéine à F-box et riche en leucine 2 ; FKBP8 = Protéine liant FK506 ; Hsp90 = Protéine de choc thermique 90 ; PA28 $\gamma$  = activateur du protéasome 28 $\gamma$ . (Adapté de Moriishi and Matsuura, 2007)

(B) Influence des lipides cellulaires sur la réplication de l'ARN viral. Les complexes de réplication de l'ARN viral décrits dans la figure A sont localisés dans des niches membranaires dérivées du RE et possédant une composition de type "radeau lipidique" (lipid raft). Ainsi, le cholestérol et la sphingomyéline, faisant partie de ces lipid rafts, sont nécessaires à la réplication virale. Deux protéines cellulaires, la protéine géranylgeranylée FBL-2 (inhibée par les statines) et la phosphatidylinositol 4-kinase III $\alpha$  (PI4K-III $\alpha$ ), seraient impliquées dans la localisation et la fonction du complexe de réplication via une interaction avec la protéine virale NS5A. Enfin, des antagonistes du récepteur  $\alpha$  activé par les proliférateurs de peroxyosomes (PPAR $\alpha$ ) impliqué dans la régulation du métabolisme gluco-lipidique sont responsables de la désorganisation et de la dispersion des complexes de réplication. (Extrait de Herker and Ott, 2011)

Le mécanisme de réplication est fortement dépendant du métabolisme lipidique de la cellule. En effet, la réplication de l'ARN viral se situerait au niveau de "radeaux lipidiques" (lipid rafts) riches en cholestérol et en sphingolipides (Sakamoto et al., 2005). Des protéines de liaison aux protéines membranaires associées aux vésicules (VAP) jouent ainsi un rôle important dans la localisation des complexes de réplication au niveau des radeaux lipidiques. Ces protéines interagissent à la fois avec NS5A et NS5B, permettant la formation d'un complexe multi-protéique et sa localisation au niveau des radeaux lipidiques (Figure 18) (Evans et al., 2004; Gao et al., 2004; Hamamoto et al., 2005). L'interaction de NS5A avec VAP-A est régulée par son état de phosphorylation. L'hyperphosphorylation de la protéine NS5A entraîne l'inhibition de son interaction avec VAP-A, ce qui dissocierait le complexe de réplication (Evans et al., 2004). Le niveau de phosphorylation de NS5A fonctionnerait ainsi comme un interrupteur moléculaire régulant la balance entre réplication et

assemblage. Une étude récente a montré une interaction entre les protéines non structurales NS4B, NS5A et NS5B et l'Annexine A2, une protéine impliquée dans l'organisation des radeaux lipidiques riches en cholestérol (Saxena et al., 2012). Cette protéine pourrait donc être impliquée dans la formation des radeaux lipidiques à proximité des protéines virales alors que d'autres protéines comme VAP-A seraient responsables de leur regroupement.

La formation des complexes de réplication est intrinsèquement dépendante du métabolisme lipidique de l'hôte et notamment de la synthèse du cholestérol et de la sphingomyéline, nécessaires à la formation des radeaux lipidiques (Figure 18). Nous verrons plus tard que la protéine virale core joue un rôle important dans la régulation du métabolisme lipidique cellulaire (cf. §3.3.3). La voie de synthèse du cholestérol, ou voie du mévalonate, permet également la synthèse du lipide géranylgeranyl à partir du farnésyl, un intermédiaire de réaction (Ye, 2007). Or, il a été démontré qu'une ou plusieurs protéines cellulaires géranylgeranylées étaient indispensables à la réplication virale (Kapadia and Chisari, 2005). Une de ces protéines est une protéine à F-box riche en leucine (FBL-2) qui s'associe à la membrane de RE et à NS5A grâce à sa géranylgeranylation (Ye, 2007). L'interaction entre FBL-2 et NS5A est indispensable à la réplication et il a été suggéré que FBL-2 serait impliqué dans l'ubiquitination et la dégradation par le protéasome de protéines inhibant la réplication virale (Moriishi and Matsuura, 2007). L'inhibition directe (lovastatine) ou indirecte (antagonistes du récepteur  $\alpha$  activé par les proliférateurs de peroxyosomes PPAR $\alpha$ ) entraîne ainsi une dissociation des complexes de réplication (Lyn et al., 2009). Enfin, l'activité enzymatique d'une lipide kinase cellulaire PI4K-III $\alpha$  (phosphatidylinositol-4 kinase III  $\alpha$ ) a récemment été impliquée dans la réplication du HCV (Berger et al., 2009; Reiss et al., 2011). Plus précisément, cette kinase interagit avec NS5A qui stimule son activité enzymatique permettant la synthèse de phosphatidylinositol-4-phosphate (PI4P). La synthèse de PI4P par la kinase PI4K-III $\alpha$  au niveau du complexe de réplication semble indispensable à la mise en place des structures membranaires nécessaires à la réplication virale.

Après formation du complexe de réplication grâce à l'intervention de nombreux facteurs cellulaires, la réplication de l'ARN viral, modulée par l'interaction entre les régions non codantes 5' et 3' peut commencer. La liaison du micro-ARN miR-122 aux deux sites présents en amont de l'IRES (Figure 11) est néanmoins nécessaire à la réplication du génome (Jopling et al., 2005, 2008).

### **3 Le foie, organe cible du virus de l'hépatite C**

Le foie est l'organe le plus volumineux de l'organisme, pesant entre 1200 et 1500g en fonction des individus. Ses fonctions sont requises pour maintenir une homéostasie au sein de l'organisme. Il est en effet impliqué dans la synthèse de nombreuses molécules et complexes macromoléculaires essentiels, dans le métabolisme et la dégradation de nombreux nutriments et xénobiotiques en provenance du tractus digestif, dans le stockage et l'excrétion de nombreux métabolites, et dans la neutralisation de substances toxiques ou de pathogènes. Toutes ces fonctions sont réalisées par un organe unique possédant une structure complexe.

L'infection du foie par HCV entraîne l'altération d'un certain nombre des fonctions hépatiques, contribuant à la pathogenèse virale. C'est pourquoi nous allons détailler ci-après l'organisation et les rôles du foie afin de mieux comprendre la physiopathologie de l'infection virale.

### 3.1 Organisation du foie

#### 3.1.1 Populations cellulaires

Le foie est un tissu parenchymateux composé d'un moins 7 types cellulaires distincts : des hépatocytes, des cholangiocytes, des cellules endothéliales fenestrées, des macrophages, des lymphocytes, des cellules dendritiques, et des cellules étoilées. Chacune de ces cellules possède à la fois des fonctions qui lui sont propres et d'autres qu'elle partage avec les autres types cellulaires hépatiques (Grisham, 2009). Les hépatocytes sont les cellules les plus importantes du parenchyme hépatique, représentant plus de 80% du volume du foie, et assurant les fonctions principales que nous détaillerons ultérieurement. Ces hépatocytes sont irrigués par des capillaires spécialisés, les sinusoides, composées de 5 types cellulaires distincts (Figure 19).

Les cellules endothéliales du foie (LSEC) forment la paroi du sinusoides. Elles possèdent des fenestrations d'un diamètre moyen de 100-150nm, permettant le passage de molécules et complexes macromoléculaires d'un diamètre inférieur, tels que les résidus de chylomicrons. De plus, elles jouent un rôle important dans la clairance hépatique grâce à leur forte activité d'endocytose dépendant des récepteurs, capable d'éliminer de nombreuses macromolécules présentes dans le sang. Elles expriment à leur surface de nombreuses molécules d'adhésion et sécrètent des chimiokines impliquées dans le recrutement des cellules immunitaires. Enfin, ce sont des acteurs clés de l'angiogenèse et de la vasculogenèse du foie, jouant un rôle majeur au cours de la régénération hépatique, et par extension au cours de la tumorigenèse (Semela and Shah, 2008).

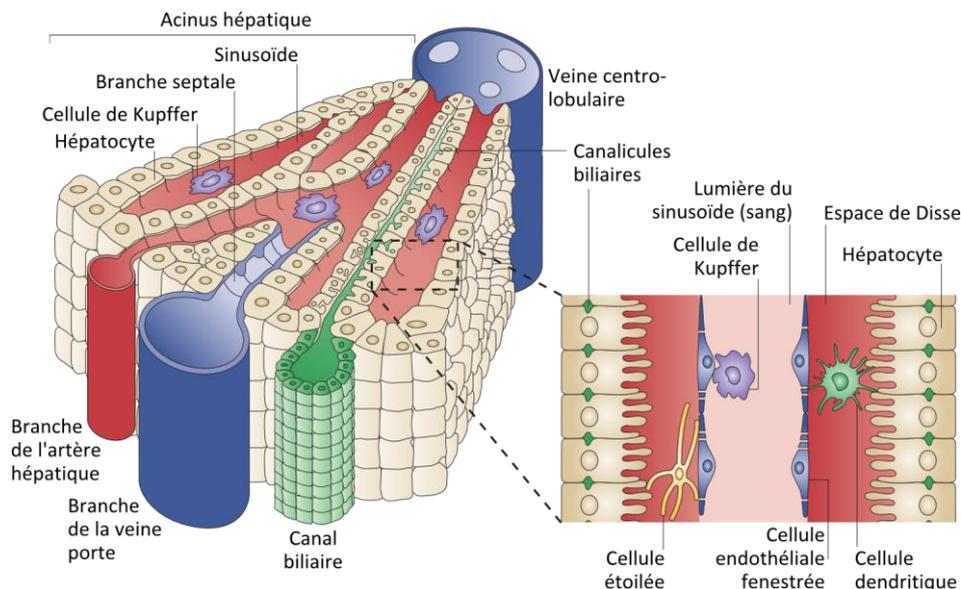
Les cellules de Kupffer sont les macrophages résidents du foie. Elles sont ancrées au niveau de la lumière des sinusoides par des extensions cytoplasmiques qui peuvent traverser les fenestrations des LSEC et interagir avec les cellules étoilées ou les hépatocytes. Ces cellules sont ainsi en contact permanent avec le sang. Ce sont des phagocytes spécialisés dans la capture et la dégradation des particules de taille importante ( $> 1\mu\text{m}$ ) qui circulent dans le sang et qui ne sont pas éliminées par les cellules endothéliales. La seconde fonction des cellules de Kupffer est la sécrétion de médiateurs inflammatoires, dont des cytokines telles que TNF- $\alpha$ , IL-6 et IL-10, qui vont permettre de recruter les cellules de l'immunité innée et de moduler leur activité (Jaeschke, 2008). Enfin, il a été suggéré que les cellules de Kupffer pourraient également jouer le rôle de cellules présentatrices de l'antigène permettant de réguler l'activité des lymphocytes T (Crispe, 2009).

Des cellules dendritiques (5%), des lymphocytes (40%) et des cellules NK (25%) et NKT (30%) sont également présents au niveau des sinusoides et fortement associés au foie. Ces cellules immunitaires sont phénotypiquement différentes de celles retrouvées dans la circulation générale, activées, prolifératives et sont impliquées dans la détection et l'élimination des pathogènes hépatiques, mais aussi dans la mise en place d'une tolérance immunologique complexe vis-à-vis des antigènes exogènes (Luedde et al., 2008).

Les dernières cellules présentes au niveau des sinusoides sont les cellules étoilées hépatiques. Elles sont localisées dans l'espace de Disse, entre les LSEC et les hépatocytes, avec lesquels elles sont en contact étroit par l'intermédiaire d'extensions cytoplasmiques longues et fines. Ce sont des myofibroblastes spécialisés dans le stockage et le métabolisme de lipides tels que la vitamine A (rétinol) et les triglycérides. Les cellules étoilées hépatiques sont également responsables de la synthèse de la matrice extracellulaire présente au niveau de l'espace de Disse, favorisant la cohésion, la communication et la différenciation des divers types cellulaires. L'activation de ces cellules étoilées par une réponse inflammatoire, entre autres, entraîne une augmentation de la sécrétion de matrice

extracellulaire, facteur majeur du développement pathologique d'une fibrose hépatique (Pinzani, 2008). Des études récentes ont également suggéré que ces cellules étoilées pourraient avoir un rôle de cellules présentatrices de l'antigène (Crispe, 2009).

Pour finir, les cellules épithéliales des canaux biliaires, ou cholangiocytes, sont quant à elles responsables de la canalisation de la bile et du maintien de son homéostasie via l'absorption et la sécrétion de nombreux solutés. Elles possèderaient également des fonctions immunologiques permettant de lutter contre les parasites présents dans la bile (Dufour, 2008).



**Figure 19.** Organisation spatiale d'un acinus hépatique.

Le foie est composé de nombreux lobules hépatiques juxtaposés, contenant plusieurs acini hépatiques, chacun définissant une unité fonctionnelle hépatique. 75% de l'apport sanguin hépatique provient de la veine porte et le reste de l'artère hépatique. Des ramifications de ces vaisseaux sanguins, ainsi que des canaux biliaires sont situés au niveau des espaces portes interlobulaires (en bas sur le schéma). Le sang circulant dans ces vaisseaux est distribué dans l'acinus hépatique par les sinusoides, puis évacué au niveau de la veine centro-lobulaire. La bile synthétisée par les hépatocytes et circulant dans les canalicules biliaires de manière centrifuge est acheminée jusqu'au canal biliaire situé au niveau de l'espace porte. Les sinusoides sont structurés par des cellules endothéliales sinusoides, caractérisées par l'absence de jonctions serrées et de membrane basale et la présence de fenestrations, permettant le libre passage de molécules. Les sinusoides contiennent également des cellules de Kupffer, des cellules étoilées hépatiques sécrétant la matrice extracellulaire de l'espace de Disse et des cellules dendritiques parenchymateuses quittant le foie via l'espace de Disse. (Extrait de Adams and Eksteen, 2006)

### 3.1.2 Organisation spatiale

Le foie est une masse parenchymateuse, parcourue par de nombreux vaisseaux sanguins afférents et efférents qui, grâce à leur tissu conjonctif, jouent un rôle de support structural hépatique. Ces vaisseaux sont regroupés au niveau des espaces portes contenant également des canaux biliaires, des vaisseaux lymphatiques et des nerfs. Leur tissu conjonctif est continu avec la capsule de Glisson, une fine capsule conjonctive qui entoure le foie. Le parenchyme hépatique est ainsi perfusé avec du sang à faible pression et faible débit grâce à un réseau unique de vaisseaux

sanguins et de capillaires fenestrés, les sinusoides, apportant du sang de 2 origines différentes : du sang veineux provenant de l'intestin, du pancréas et de la rate par la veine porte ; et du sang artériel systémique par l'artère hépatique (Grisham, 2009).

L'unité structurale du foie, le lobule hépatique, est composée essentiellement d'hépatocytes regroupés autour d'une veine centro-lobulaire, drainant le sang apporté par les vaisseaux de l'espace porte à travers les capillaires sinusoides qui permettent de perfuser les hépatocytes. En parallèle, la bile sécrétée par les hépatocytes au niveau des canalicules biliaires circule de manière centrifuge vers les canaux biliaires présents au niveau de l'espace porte (Figure 19). Chaque lobule hépatique est irrigué par plusieurs espaces portes, qui sont eux-mêmes situés à la jonction de plusieurs lobules. Cette disposition lobulaire a pour conséquence la création d'un gradient centrifuge de disponibilité en oxygène et de concentration en nutriments et en particules, entraînant le développement d'un phénotype distinct entre les hépatocytes péri-portaux et les hépatocytes centro-lobulaires et ayant un rôle important dans la pathogenèse hépatique. L'unité fonctionnelle du foie, l'acinus hépatique, est définie comme la zone située entre un espace porte et une veine centro-lobulaire, irriguée par une branche septale issue de la veine porte (Figure 19).

### **3.1.3 Polarisation des hépatocytes**

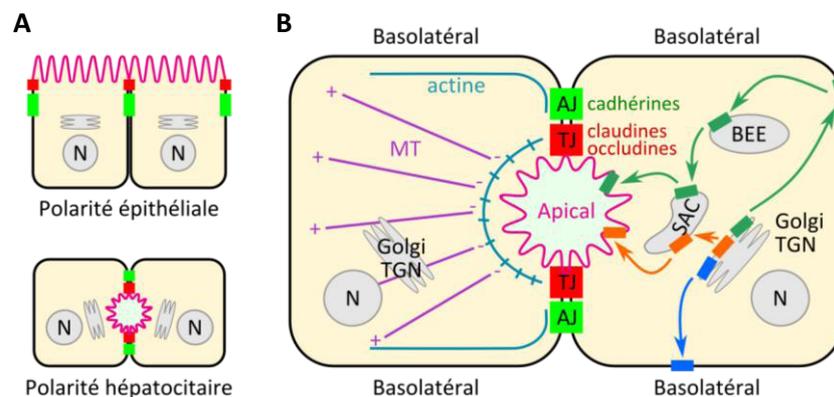
#### **3.1.3.1 Structure et fonction**

Les hépatocytes possèdent une structure polarisée atypique, indispensable à l'exécution de leurs fonctions physiologiques. Comme toutes les cellules épithéliales, les hépatocytes sont polarisés, présentant des membranes apicales et basolatérales en contact avec des environnements différents (respectivement externe et interne). Ces membranes possèdent des compositions lipidiques et protéiques distinctes ayant un rôle dans leurs fonctions physiologiques. La polarisation des cellules épithéliales est également visible à la répartition des organelles dans la cellule. Ainsi, typiquement, le Golgi est situé entre le noyau et la surface apicale dans la plupart des cellules épithéliales. Ce qui distingue les hépatocytes des autres cellules épithéliales est l'organisation spatiale de sa polarité. En effet, contrairement à la plupart des cellules épithéliales dont le pôle apical et le pôle basal sont localisés de part et d'autre de la cellule, les hépatocytes possèdent un domaine apical réduit (environ 10% de la surface membranaire) et localisé entre les cellules, formant ainsi des canalicules biliaires (Figure 20). Le reste de la surface membranaire est de type basolatéral, en contact avec au moins deux sinusoides différents (Renato et al., 2008; Braiterman and Hubbard, 2009). D'une manière générale, la membrane basolatérale contient des transporteurs permettant de faciliter la diffusion de substances depuis le sang vers l'hépatocyte, alors que la membrane apicale contient des transporteurs actifs qui permettent d'excréter des substances vers les canalicules biliaires en utilisant de l'ATP comme source d'énergie (Renato et al., 2008). L'échange de substances entre les sinusoides et les canalicules biliaires est minime puisque ces deux compartiments sont isolés par la présence de jonctions intercellulaires étanches, les jonctions serrées, délimitant les canalicules biliaires (Figure 20). Les fonctions de cette polarisation hépatocytaire sont nombreuses et seront illustrées dans les paragraphes qui suivent.

#### **3.1.3.2 Bases moléculaires**

La polarisation des hépatocytes est structurellement définie par la localisation des jonctions serrées, situées en périphérie des canalicules biliaires, et des jonctions adhérentes, plus basales. Les jonctions adhérentes sont des structures d'adhésion intercellulaires, principalement composées de molécules d'adhésion dépendant du calcium, les cadhérines, reliées au cytosquelette d'actine par

l'intermédiaire de caténines. La formation de ces jonctions adhérentes est importante pour maintenir la cohésion tissulaire et serait nécessaire à la formation des jonctions serrées au cours de l'acquisition de la polarisation hépatocytaire (Braiterman and Hubbard, 2009). Les jonctions serrées, aussi appelées jonctions étanches, sont, quant à elles, principalement composées des protéines claudine et occludine et permettent d'assurer une séparation physique étanche entre les compartiments apicaux (bile) et basolatéraux (sang). Ces jonctions étanches sont également reliées au cytosquelette d'actine (Figure 20). L'acquisition et le maintien de la polarisation cellulaire requièrent la collaboration de nombreux processus : l'adhésion cellulaire ; la reconnaissance des éléments du cytosquelette ; l'assemblage des jonctions serrées et des jonctions adhérentes ; et un trafic vésiculaire polarisé permettant de régionaliser la distribution des protéines et des lipides membranaires.



**Figure 20.** Polarisation des hépatocytes.

(A) Pour comparaison, la polarisation classique de cellules épithéliales est représentée, ainsi que celle des hépatocytes. Les membranes cellulaires représentées en noir sont les membranes basolatérales en contact avec le milieu interne (sang) et les membranes cellulaires représentées en rose sont les membranes apicales en contact avec le milieu externe (lumière de l'intestin, bile, etc.). Les jonctions serrées (TJ, rouge) et les jonctions adhérentes (AJ, vert) sont signalées, ainsi que la position du Golgi et du réseau trans-golgien (TGN) par rapport au noyau (N). (Adapté de Zegers and Hoekstra, 1998)

(B) L'organisation et l'orientation du cytosquelette permet la réorganisation des organites intracellulaires vers le pôle apical ou le pôle basolatéral. L'actine joue un rôle important dans le maintien de la structure cellulaire en relation avec les jonctions adhérentes et serrées. Les microtubules (MT) permettent la motilité des organites. La composition majoritaire de ces dernières est indiquée. A droite, le trafic intracellulaire des protéines membranaires néosynthétisées est représenté. Pour simplifier, les protéines basolatérales sont exportées directement à la membrane (en bleu) alors que les protéines canaliculaires sont, soit dirigées directement vers la membrane apicale en passant par le compartiment de tri subapical (SAC) (en orange), soit exportées à la membrane basolatérale, puis elles subissent une transcytose via les endosomes précoces basolatéraux (BEE) puis le compartiment subapical (en vert). (Adapté de Wang and Boyer, 2004)

Il existe un compartiment cellulaire particulier dans les cellules polarisées, le compartiment subapical (SAC), qui est impliqué dans le tri des protéines et des lipides destinés à la membrane apicale ou à la membrane basolatérale. Il est intéressant de noter que, même si certaines protéines canaliculaires suivent une voie d'export directe depuis le réseau trans-golgien (TGN) jusqu'à la

membrane apicale, la plupart des protéines canaliculaires sont d'abord acheminées vers la membrane basolatérale où elles subissent alors une transcytose vers la membrane apicale (Figure 20) (Wang and Boyer, 2004). Les protéines sinusoidales sont, quant à elles, directement acheminées vers la membrane basolatérale (Figure 20). Un tri similaire des lipides membranaires est réalisé dans les hépatocytes et aboutit à des compositions membranaires différentes entre pôle apical et pôle basolatéral (Zegers and Hoekstra, 1998).

### 3.1.3.3 Influence du HCV

L'infection virale semble fortement dépendante de la polarisation cellulaire. En effet, un des récepteurs d'entrée, l'occludine est exclusivement localisée au niveau du pôle apical de la cellule, puisqu'elle fait partie intégrante des jonctions serrées. Des études récentes réalisées sur des cellules HepG2 suggèrent que l'entrée virale est inhibée par une polarisation trop importante à cause de la localisation strictement apicale de l'occludine dans ce contexte (Mee et al., 2009). Un traitement des cellules réduisant la polarisation cellulaire favoriserait l'entrée virale. De plus, il semblerait que l'infection par HCV entraîne une dépolarisation des hépatocytes via la sécrétion du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) (Mee et al., 2010). Les implications d'une telle dépolarisation ne sont cependant pas encore connues et il serait intéressant de valider ces résultats *in vivo* pour mieux comprendre en quoi HCV pourrait modifier la polarisation et donc la fonctionnalité hépatocytaire.

## 3.2 Physiologie hépatique

Dans cette partie, nous allons nous intéresser à quelques unes des fonctions physiologiques du foie et des hépatocytes, en insistant tout particulièrement sur le métabolisme des lipides et des lipoprotéines, afin de mieux comprendre les multiples interactions participant à la réplication, la propagation et la pathogenèse du HCV.

### 3.2.1 Détoxification

Le foie est un organe clef des processus de détoxification de l'organisme.

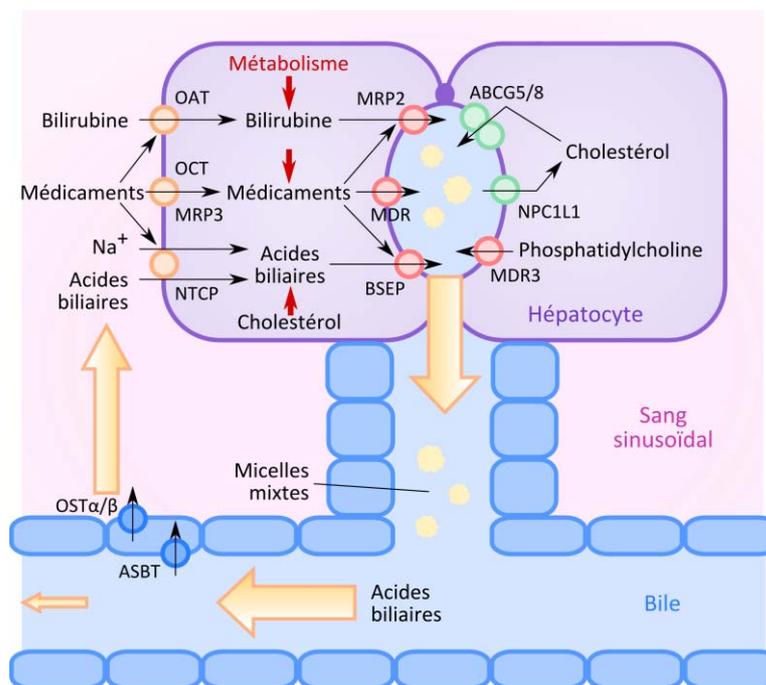
#### 3.2.1.1 Métabolisme de la bilirubine

La bilirubine provient de la dégradation de l'hème présent dans l'hémoglobine ou dans d'autres hémoprotéines telles que les cytochromes, catalases, peroxydases, etc. Entre 250 et 400 mg de bilirubine sont produits chez l'Homme chaque jour, dont 80% provient de la dégradation des globules rouges sénescents par les macrophages. La bilirubine est une molécule neurotoxique qui se fixe de manière irréversible à l'albumine libre du plasma, entraînant ainsi son inactivation. Elle est ensuite absorbée par les hépatocytes par des transporteurs spécifiques de la membrane basolatérale, stockée puis conjuguée afin de l'inactiver et de permettre son excrétion au niveau des canalicules biliaires et donc *in fine* des fèces (Figure 21) (Chowdhury and Chowdhury, 2009). La concentration sanguine de bilirubine est un témoin du bon fonctionnement hépatocytaire. Son accumulation dans le sang, notamment en cas d'hépatite C aiguë et symptomatique donne lieu à la coloration de la peau et des muqueuses en jaune, la jaunisse ou ictère cutanéomuqueux.

#### 3.2.1.2 Métabolisme des médicaments

Un second exemple de détoxification hépatique est celui de l'élimination des médicaments au cours d'un processus appelé clairance hépatique. A l'instar de la muqueuse intestinale, le foie représente une barrière efficace permettant d'éviter aux molécules xénobiotiques d'atteindre la

circulation générale. La clairance hépatique repose sur plusieurs acteurs. D'une part, des transporteurs peu spécifiques tels que des transporteurs d'anions ou de cations organiques, ou des protéines de résistance multiple aux médicaments (MDR et MRP), permettent l'absorption des molécules à détoxifier. Ensuite, deux phases de métabolisme des médicaments peuvent avoir lieu. La première repose sur un métabolisme direct par mono-oxygénation du composé grâce à des enzymes de la famille du cytochrome P450, les enzymes CYP. La deuxième phase (indépendante ou postérieure) est impliquée dans la conjugaison de radicaux hydrophiles permettant une détoxification supplémentaire. Les enzymes majeures de cette seconde phase sont les glutathion S-transférases, sulphotransférases, N-acétyltransférases et UDP-glucuronosyltransférases. Une fois métabolisés et inactivés, les médicaments sont excrétés au niveau des canaux biliaires par des transporteurs apicaux de type MDR et MRP (Figure 21) (Liddle and Stedman, 2008).



**Figure 21.** Cycle hépatique des acides biliaires et clairance hépatique.

Les acides biliaires sont produits à partir du cholestérol, puis sécrétés dans la bile au niveau des canalicules. La majorité est recyclée au niveau des canaux biliaires et n'atteint pas le système digestif. Dans la bile, ils jouent, entre autres, un rôle de détergent permettant de créer des micelles mixtes nécessaires à la solubilisation des lipides tels que le cholestérol ou la phosphatidylcholine. Les principaux transporteurs basolatéraux et apicaux impliqués dans l'absorption et la sécrétion des acides biliaires, de la bilirubine, des médicaments et de leurs formes conjuguées sont représentés. ABCG = transporteur à cassette liant l'ATP, sous-famille G ; ASBT = transporteur apical des acide biliaires dépendant du sodium ; BSEP = pompe d'export des acides biliaires ; MDR = protéine de résistance multiple aux médicaments ; MRP = protéine associée à une résistance multiple aux médicaments ; NPC1L1 = protéine 1 similaire à Niemann-Pick C1 ; NTCP = polypeptide co-transporteur de sodium et de taurocholate ; OAT = transporteur d'anions organiques ; OCT = transporteur de cations organiques ; OST = transporteur de solutés organiques. (Adapté de Jansen and Faber, 2008)

### **3.2.2 Sécrétion des acides biliaires**

Les acides biliaires possèdent de nombreuses fonctions physiologiques : ils constituent le principal soluté de la bile ; ils sont indispensables pour la sécrétion hépatique du cholestérol et des phospholipides ; ils forment des micelles dans la bile, permettant de solubiliser les composés lipophiles ; ils permettent la dissolution et l'hydrolyse des triglycérides au cours de la digestion ; ils possèdent des fonctions de régulation du métabolisme intermédiaire. Les acides biliaires suivent un cycle entéro-hépatique : ils sont synthétisés au niveau du foie, sécrétés dans la bile, atteignant ainsi l'intestin où ils participent à la digestion. La majorité des acides biliaires (90 à 95%) est réabsorbée par les entérocytes, libérée dans le sang, puis de nouveau absorbée par les hépatocytes, terminant ainsi la boucle entéro-hépatique (Jansen and Faber, 2008; Dawson et al., 2009).

La biosynthèse des acides biliaires est un processus métabolique complexe qui s'effectue à partir d'une molécule de cholestérol, transformée par 16 enzymes différentes en acides biliaires primaires, l'acide cholique et l'acide chénodésoxycholique (CDCA) (Jansen and Faber, 2008). Des transporteurs spécifiques sont impliqués dans l'absorption facilitée des acides biliaires au niveau de la membrane basolatérale des hépatocytes et dans leur sécrétion active au niveau des canalicules (Figure 21) (Dawson et al., 2009). La synthèse d'acides biliaires peut ainsi être considérée, entre autres, comme un mécanisme d'élimination du cholestérol. De plus, il est important de considérer l'activité transcriptionnelle de ces molécules qui sont capables, via l'activation du récepteur nucléaire au farnésioïde X (FXR), de réprimer l'expression de gènes impliqués dans la synthèse des acides gras, des triglycérides et des acides biliaires, permettant ainsi un feed-back négatif provenant de l'intestin, en fonction de l'apport alimentaire en lipides (Jansen and Faber, 2008). En effet, il a été montré que les acides biliaires sont capables d'inhiber la sécrétion de VLDL dans des hépatocytes primaires (Lin et al., 1996). Ils sembleraient également influencer la réplication du HCV, probablement en entraînant une modification de la quantité intracellulaire de cholestérol (Chang and George, 2007).

### **3.2.3 Métabolisme glucidique**

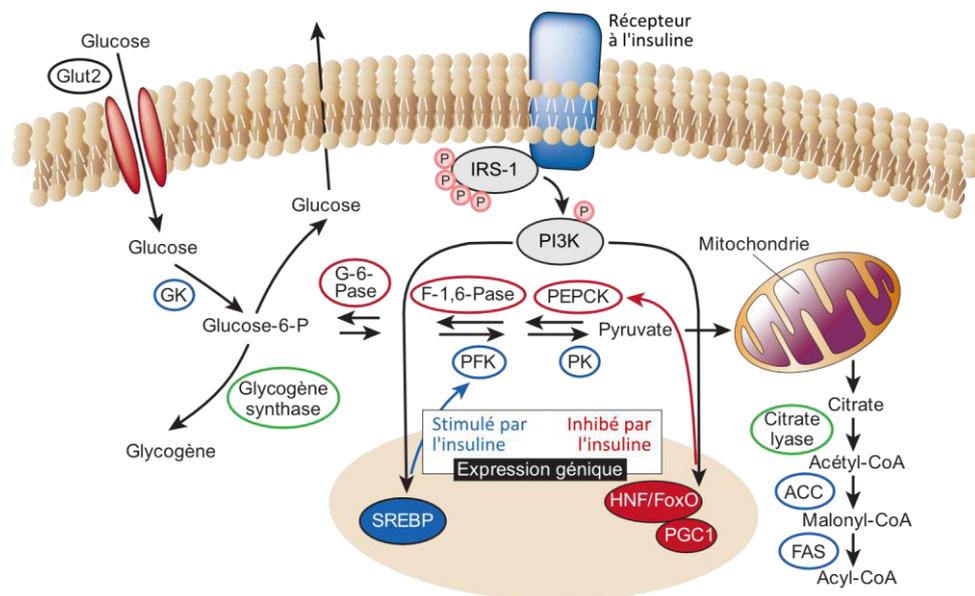
#### **3.2.3.1 Synthèse et stockage du glucose**

Le foie est au cœur de la régulation de la glycémie. Il est en charge de plus de 90% de la production de glucose endogène, nécessaire à alimenter continuellement l'organisme en dehors des repas. Suite à l'ingestion de glucides, le foie absorbe entre 1/4 à 1/3 du glucose libéré par la digestion. L'entrée du glucose dans les hépatocytes se fait par diffusion facilitée grâce au transporteur GLUT2. La majorité du glucose absorbé est stockée sous forme de glycogène, le reste étant oxydé ou utilisé pour la lipogenèse (Figure 22). En cas de besoin de l'organisme, les hépatocytes sont capables de libérer du glucose dans le sang par deux voies métaboliques distinctes : la glycogénolyse qui hydrolyse les stocks de glycogène insolubles en glucose et la néoglucogenèse qui permet la synthèse de glucose *de novo* à partir de divers précurseurs (lactate, pyruvate, certains acides aminés et glycérol). En conditions normales, après une nuit sans apport glucidique externe, la glycogénolyse et la gluconéogenèse semblent contribuer de manière équivalente à la production de glucose endogène (Boden, 2008).

#### **3.2.3.2 Régulation de la glycémie**

La discontinuité de l'apport glucidique alimentaire contraste avec un besoin continu en glucidiques énergétiques pour les organes et le cerveau. Le maintien d'une concentration sanguine en glucose constante est donc déterminant. Le foie joue un rôle majeur dans la régulation de la glycémie en réponse à divers stimuli, notamment la concentration en glucose, en acides gras libres,

mais surtout en glucagon et en insuline, deux hormones pancréatiques. Le glucagon induit une augmentation de la glycogénolyse entraînant une sécrétion de glucose par les hépatocytes pour compenser une hypoglycémie existante ou pour contrer son apparition suite à un repas pauvre en glucides. L'insuline, quant à elle, inhibe la glycogénolyse et la néoglucogenèse, réduisant la sécrétion de glucose et favorisant son stockage sous forme de glycogène ou de lipides (Saltiel and Kahn, 2001; Boden, 2008). La signalisation en aval du récepteur à l'insuline dépend du substrat du récepteur à l'insuline (IRS-1) et de la phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) (Figure 22).



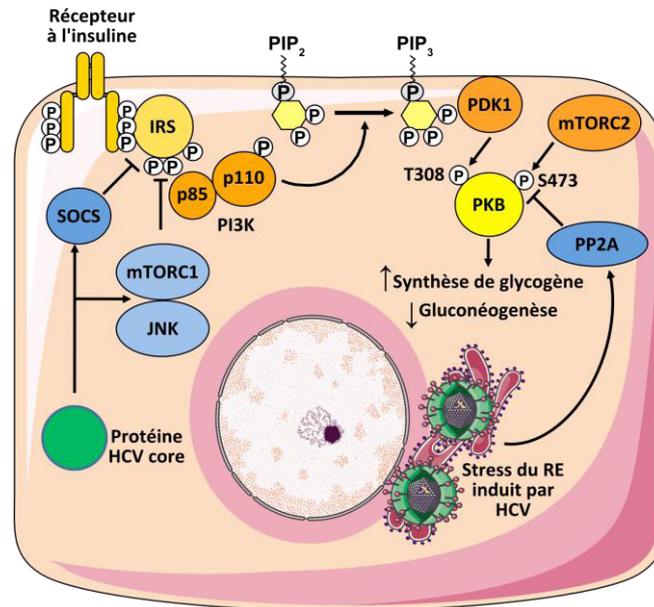
**Figure 22.** Régulation du métabolisme du glucose dans le foie.

Le glucose pénètre dans les hépatocytes grâce au transporteur Glut2. L'insuline stimule le stockage du glucose dans les hépatocytes en modifiant l'expression de gènes spécifiques. La liaison de l'insuline à son récepteur entraîne la phosphorylation d'IRS-1 qui va à son tour activer la PI3K, permettant *in fine* la stimulation de l'expression des enzymes impliquées dans le stockage du glucose (en bleu), et la répression de l'expression des enzymes de la néoglucogenèse (en rouge). Cette régulation de l'expression génique passe par les facteurs de transcription SREBP-1, HNF-4, FoxO1 et PGC1. Certaines enzymes voient leur activité modulée uniquement par des modifications post-traductionnelles (en vert) de type phosphorylation. GK = glucokinase ; G-6-Pase = glucose-6-phosphatase ; F-1,6-Pase = fructose-1,6-bisphosphatase ; PEPCCK = phosphoenolpyruvate carboxykinase ; PFK = phosphofructokinase ; PK = pyruvate kinase ; ACC = acétyl-CoA carboxylase ; FAS = acide gras synthase ; SREBP = protéine de liaison aux éléments de réponse aux stéroïdes ; HNF = facteur nucléaire hépatique ; Fox = protéine de la famille forkhead ; PGC = co-activateur de PPAR $\gamma$ . (Adapté de Saltiel and Kahn, 2001)

### 3.2.3.3 Résistance à l'insuline et HCV

Le diabète de type 2 est une conséquence majeure d'une insensibilité à l'insuline due à une déficience de la voie de signalisation intracellulaire. Cette résistance à l'insuline est fréquente parmi les patients atteints d'hépatite C chronique et passe notamment par l'inhibition de l'activation de la protéine IRS-1, et/ou la dérégulation de la protéine phosphatase 2 A (PP2A) qui inhibe la transduction du signal en aval de la PI3K (Figure 23) (Bugianesi et al., 2012). Récemment, il a également été suggéré que l'infection par HCV entraînerait une stimulation de l'activité du facteur de

transcription FoxO1, normalement réprimé par l'insuline, conduisant à une augmentation de la néoglucogenèse dans les hépatocytes infectés (Deng et al., 2011).



**Figure 23.** Résistance à l'insuline induite par les protéines virales.

L'expression de la protéine virale core *in vitro* comme *in vivo* entraîne la surexpression du suppresseur de signal cytokinique SOCS ainsi que l'activation des voies mTOR (cible de la rapamycine) et JNK (c-Jun N-terminal kinases), entraînant la dégradation ou l'inhibition du substrat du récepteur à l'insuline IRS-1. La surexpression de la phosphatase PP2A en conséquence du stress du RE induit par la réplication virale pourrait également inhiber la transduction du signal en aval du récepteur à l'insuline en déphosphorylant la protéine kinase B (PKB ou Akt). PI3K = Phosphatidylinositol-3 kinase ; PIP = Phosphatidylinositol-phosphate ; PDK1 = protéine kinase dépendant du PIP3 (Extrait de Bugianesi et al., 2012)

### 3.2.4 Métabolisme lipidique

#### 3.2.4.1 Cycle plasmatique des lipoprotéines

Les lipides étant insolubles dans les solvants aqueux, leur transport dans l'organisme se fait par l'intermédiaire de particules structurées, les lipoprotéines. Ces lipoprotéines sont composées de lipides neutres (esters de cholestérol et triglycérides), entourés par une monocouche de phospholipides contenant du cholestérol, le tout étant stabilisé par des protéines membranaires, les apolipoprotéines (Figure 24) (Blasiolo et al., 2007). Les lipoprotéines sont synthétisées par deux organes différents, l'intestin et le foie. L'intestin sécrète des chylomicrons permettant d'alimenter l'organisme avec les lipides apportés par l'alimentation. Le foie, quant à lui, sécrète des lipoprotéines de très faible densité (VLDL) permettant d'alimenter continuellement l'organisme en lipides et jouant notamment un rôle important dans le transport du cholestérol. Le détail du cycle plasmatique des lipoprotéines est détaillé ci-dessous (Figure 24).

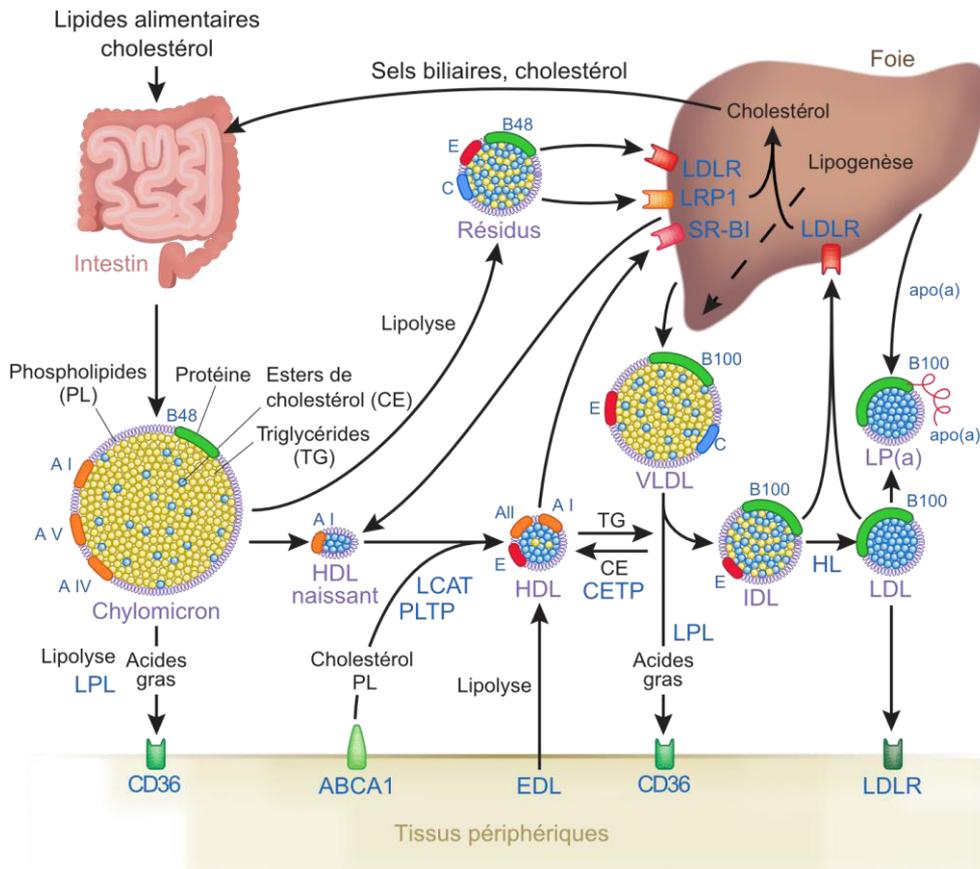
La classification des lipoprotéines est basée sur leurs caractéristiques physico-chimiques. Ainsi, chaque population possède une densité, une taille et une composition lipidique distinctes, mais aussi une composition protéique distincte (Tableau 1). En effet, l'apolipoprotéine B (apoB) est la protéine structurant les chylomicrons et les VLDL. Une seule molécule d'apoB est présente par chylomicron ou par VLDL. On la retrouve également sur les lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL) et de faible

densité (LDL), puisque ces dernières sont issues de la lipolyse des VLDL. Par contre, les apolipoprotéines A, C et E sont échangeables et peuvent être transférées d'une lipoprotéine à l'autre. La protéine apoB existe sous deux formes distinctes suite à l'édition de son ARN messager. Ainsi, les cellules intestinales sécrètent des chylomicrons possédant une version tronquée d'apoB (apoB48), incapable d'interagir avec le récepteur aux LDL (LDLR), alors que les hépatocytes sécrètent des VLDL possédant la version complète d'apoB (apoB100) (Figure 24). Par contre, les lipoprotéines de forte densité (HDL) sont dépourvues d'apoB.

	<b>Chylomicrons</b>	<b>VLDL</b>	<b>IDL</b>	<b>LDL</b>	<b>HDL</b>
<b>Densité (g/mL)</b>	< 0,95	0,95-1,006	1,006-1,019	1,019-1,063	1,063-1,21
<b>Diamètre (nm)</b>	75-120	30-80	25-35	18-25	5-12
<b>Protéines (%)</b>	2	10	18	25	33
<b>Triglycérides (%)</b>	83	50	31	9	8
<b>Cholestérol (%)</b>	8	22	29	45	30
<b>Phospholipides (%)</b>	7	18	22	21	29
<b>Apolipoprotéines principales</b>	B48, A-I, A-IV, E, C-I, C-II, C-III	B100, E, C-I, C-II, C-III	B100, E, C-I, C-II, C-III	B100	A-I, A-II, C-I, C-II, C-III, E

**Tableau 1.** Caractéristiques physico-chimiques des lipoprotéines humaines.  
(Adapté de Cohen, 2009)

Les triglycérides transportés par les chylomicrons et les VLDL sont hydrolysés en acides gras par la lipoprotéine lipase (LPL) présente à la surface des capillaires et des artères, ce qui permet d'alimenter les tissus périphériques en acides gras. La lipolyse des chylomicrons les transforme rapidement en résidus de chylomicrons qui sont alors endocytés par les hépatocytes via l'interaction d'apoE avec LDLR ou LRP1 (protéine relative au LDLR), puis métabolisés. La lipolyse des VLDL entraîne de la même manière la formation d'IDL voire de LDL. Les LDL seraient dépourvues d'apoE et d'apoC à cause d'une perte d'affinité au cours de la lipolyse des IDL (Cohen, 2009). Les HDL sont produites au cours de la lipolyse des chylomicrons et des VLDL. Une partie provient également de la sécrétion de particules apoA-positives par les hépatocytes. La maturation des HDL s'effectue ensuite par acquisition et estérification de cholestérol au niveau des tissus périphériques et échanges de phospholipides et d'esters de cholestérol avec les autres lipoprotéines. La fixation des HDL au récepteur scavenger classe B, type I (SR-BI) à la surface des hépatocytes permet également des échanges de cholestérol. Les HDL jouent ainsi un rôle important dans le transport réverse du cholestérol depuis les tissus périphériques (Figure 24).



**Figure 24.** Cycle plasmatique des lipoprotéines.

Les lipides alimentaires sont absorbés par l'intestin et sécrétés dans le sang sous forme de chylomicrons contenant des triglycérides (TG, en jaune), des esters de cholestérol (CE, en bleu), des phospholipides (PL, en gris) et des apolipoprotéines (apoB48, apoA-I, A-IV et A-V). Les TG contenus dans les chylomicrons sont hydrolysés sous l'action de la lipoprotéine lipase (LPL) à la surface des capillaires et des artères, permettant d'alimenter les tissus périphériques en acides gras, absorbés par le récepteur scavenger CD36. La lipolyse des chylomicrons les transforme en résidus ("remnant"), pris en charge au niveau du foie par endocytose suite à la reconnaissance d'apoE par le récepteur aux LDL (LDLR) et un récepteur apparenté (LRP1). Au cours de la lipolyse, les chylomicrons perdent des phospholipides et des protéines de surface, donnant naissance à des précurseurs des HDL. Les hépatocytes produisent également des lipoprotéines de très faible densité contenant TG et CE, les VLDL, possédant à leur surface les apolipoprotéines apoB100, apoC et apoE. La lipolyse des VLDL par la LPL entraîne l'apparition de lipoprotéines de plus forte densité, les IDL qui peuvent être capturées par les hépatocytes via le LDLR. Une lipolyse plus poussée des IDL par la LPL ou par la lipase hépatique (HL) permet l'apparition de LDL qui possèdent toujours apoB mais plus apoE. La cinétique d'endocytose des LDL étant beaucoup plus lente, ces lipoprotéines constituent la réserve majeure circulante de cholestérol dans l'organisme. Ces LDL peuvent se complexer avec la protéine apo(a) sécrétée par les hépatocytes, formant des particules Lp(a) particulièrement athérogènes. Les HDL sont formées par la sécrétion d'apoA par les hépatocytes et au cours de la lipolyse des chylomicrons et des VLDL. Les HDL acquièrent du cholestérol provenant des tissus périphériques via leur interaction avec un transporteur à cassette liant l'ATP, ABCA1. Ce cholestérol est estérifié en CE sous l'action de la lécithine-cholestérol acyltransférase (LCAT). Les protéines de transfert de CE (CETP) et de phospholipides (PLTP) sont impliquées dans le transfert de lipides entre les HDL et les autres lipoprotéines. (Adapté de Lusis and Pajukanta, 2008)

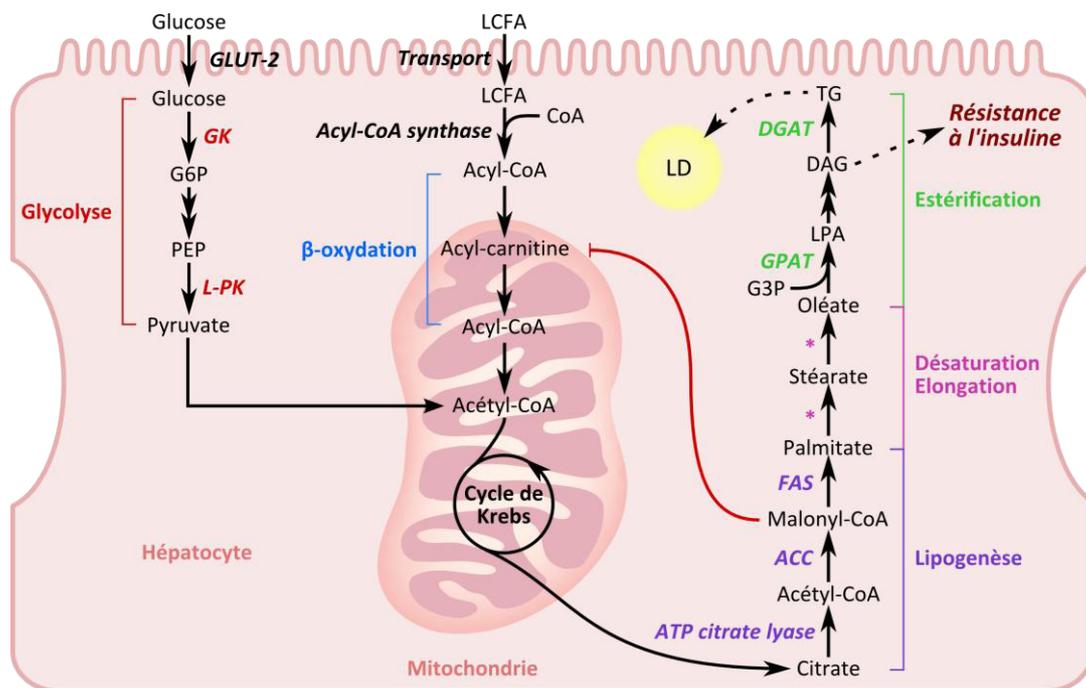
### 3.2.4.2 Synthèse et stockage hépatique des triglycérides

La régulation de la synthèse des VLDL est intimement reliée au métabolisme gluco-lipidique de l'hépatocyte. En effet, la synthèse de lipoprotéines nécessite l'incorporation d'une quantité importante de triglycérides et d'esters de cholestérol provenant de réserves cellulaires (LD), d'un apport externe par endocytose de lipoprotéines, ou d'une néosynthèse. La synthèse des triglycérides (TG) s'effectue à partir d'un intermédiaire du cycle de Krebs, le citrate. Elle peut être divisée en plusieurs étapes comprenant : la lipogénèse aboutissant à la formation d'un acide gras, le palmitate ; suivie de l'élongation et de la désaturation de cet acide gras pour former l'oléate ; puis enfin son estérification en triacylglycérol (Figure 25). Cette synthèse de TG est dépendante du métabolisme glucidique puisque la glycolyse permet d'alimenter le cycle de Krebs, fournissant ainsi le citrate, mais permet également la formation du glycérol-3-phosphate nécessaire à l'estérification, à partir du dihydroxyacétone phosphate ou du pyruvate.

Les triglycérides étant fortement hydrophobes, ils sont directement stockés au sein de gouttelettes lipidiques (LD) dans le cytoplasme. En effet, les 2 enzymes impliquées dans l'étape finale de synthèse des TG, DGAT1 et DGAT2 (diacylglycérol transférases), sont respectivement localisées : à la membrane du RE, permettant la formation des LD à partir du RE ; ou à la surface des LD, permettant leur croissance par synthèse *in situ* de TG (Yen et al., 2008). Ces LD sont des organelles dynamiques interagissant avec de nombreuses protéines cellulaires dont les protéines de la famille PAT : la périlipine, l'adipophiline ou protéine reliée à la différenciation adipeuse (ADRP) et la protéine de 47 kDa interagissant avec sa queue (TIP47). Ces protéines stabilisent les LD et régulent le recrutement et l'interaction avec d'autres protéines cellulaires (Bickel et al., 2009). La périlipine est principalement exprimée dans les adipocytes et stabilise les LD. En cas de stimulation hormonale lipolytique, elle est phosphorylée et recrute ainsi la lipase sensible aux hormones (HSL) responsable de la lipolyse des TG contenus dans la LD (Bickel et al., 2009). Dans les hépatocytes, on retrouve majoritairement l'adipophiline (ADRP) et TIP47. L'association de TIP47 avec les LD est facultative et ne serait observée que pour les LD de taille importante, les protégeant de la lipolyse (Bickel et al., 2009; Olofsson et al., 2009). Par contre, ADRP est fréquemment associée aux LD dans les hépatocytes. Contrairement à TIP47, elle est dégradée en absence de TG. Elle est associée à une protection des LD vis-à-vis de la lipolyse et sa surexpression entraînerait une augmentation du contenu en TG en empêchant la formation de VLDL (Bickel et al., 2009; Olofsson et al., 2009). Les stocks de lipides neutres des LD peuvent être mobilisés par des enzymes cellulaires telles que la triacylglycérol hydrolase (TGH) localisée à la surface du RE et qui a été récemment impliquée dans la dynamique des LD cytosoliques et dans la formation des VLDL (Wang et al., 2007, 2010a).

A l'instar du métabolisme glucidique, le métabolisme lipidique est régulé par l'insuline et les apports alimentaires. L'insuline stimule la lipogénèse via l'induction du facteur de transcription SREBP-1c. Celui-ci entraîne alors une plus forte expression de la glucokinase (GK), de l'acétyl-CoA carboxylase (ACC) et de l'acide gras synthase (FAS) (Figure 22, Figure 25), favorisant ainsi le stockage du glucose sous forme lipidique (Saltiel and Kahn, 2001; Postic and Girard, 2008). En parallèle, l'excès de glucose induit le facteur de transcription se liant aux éléments de réponse aux glucides (ChREBP), qui, à son tour, stimule l'expression de nombreux gènes impliqués dans la voie de synthèse des triglycérides, dont la pyruvate kinase (L-PK) (Postic and Girard, 2008). En condition de jeûne, deux facteurs de transcription, FoxO1 et PPAR $\alpha$ , entraînent une inhibition de la synthèse de TG au profit de la phosphorylation oxydative mitochondriale, ainsi qu'une augmentation de la sécrétion de lipoprotéines, entraînant une réduction des stocks intrahépatiques de TG (Silver, 2009).

Enfin, l'excès de lipides intracellulaires, et plus particulièrement de diacylglycérol (DAG), provenant de la lipogenèse ou de la transformation des acides gras à longue chaîne (LCFA) apportés par l'alimentation, entraîne l'apparition d'une résistance à l'insuline via l'inhibition du substrat du récepteur à l'insuline IRS-2 (Figure 25) (Postic and Girard, 2008). De plus, il semblerait que la mobilisation des réserves lipidiques provenant des adipocytes n'induit pas d'activation du facteur de transcription PPAR $\alpha$ , contrairement aux acides gras alimentaires ou néosynthétisés, ayant ainsi pour conséquence une accumulation supplémentaire de TG dans les hépatocytes et favorisant l'apparition de la résistance à l'insuline (Silver, 2009). La résistance à l'insuline hépatique peut donc être à la fois reliée au métabolisme glucidique et au métabolisme lipidique.



**Figure 25.** Voies métaboliques permettant la synthèse de triglycérides dans le foie.

La synthèse de triglycérides (TG) dans le foie est régulée par l'apport nutritionnel. Un repas pauvre en lipides et riches en glucides entraîne l'induction d'enzymes impliquées dans la glycolyse, la lipogenèse, l'élongation, la désaturation et l'estérification des acides gras permettant la synthèse de TG. Les enzymes et les étapes impliquées sont indiquées. Les TG ainsi formés sont utilisés par la cellule, exportés sous forme de lipoprotéines ou stockés, formant des gouttelettes lipidiques (LD). Le malonyl-CoA, intermédiaire de la lipogenèse, est responsable d'une inhibition de la  $\beta$ -oxydation, qui régule le transfert des acides gras à chaîne longue (LCFA) depuis le cytosol vers la mitochondrie, favorisant ainsi l'estérification des acides gras au détriment de leur oxydation. L'accumulation cellulaire de diacylglycérol (DAG) est responsable d'une inhibition du substrat du récepteur à l'insuline IRS-2 via l'activation de la protéine kinase C  $\epsilon$ , favorisant le développement d'une résistance à l'insuline. ACC = acétyl-CoA carboxylase ; DGAT = diacylglycérol acyltransférase ; FAS = acide gras synthase ; G3P = glycérol-3-phosphate ; G6P = glucose-6-phosphate ; GK = glucokinase ; GPAT = glycérol-3-phosphate acyltransférase ; L-PK = pyruvate kinase du foie ; LPA = acide lysophosphatidique ; PEP = phosphoénolpyruvate. (Adapté de Postic and Girard, 2008)

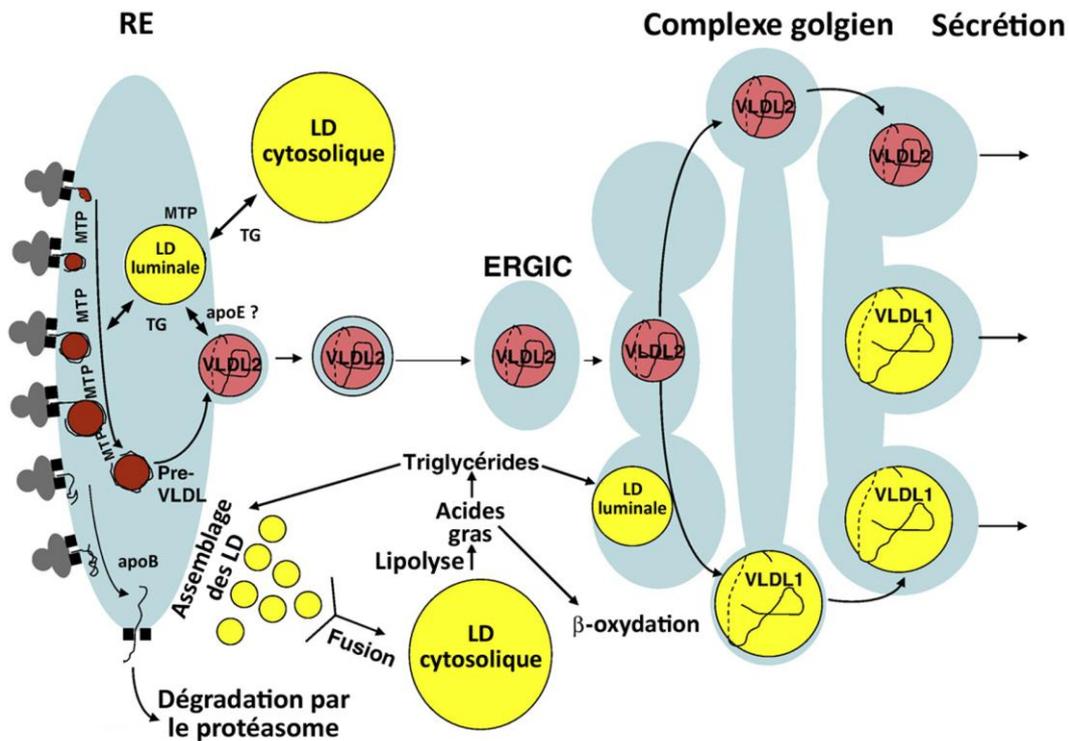
### 3.2.4.3 Morphogenèse des VLDL

La morphogenèse des VLDL commence dans la lumière de RE où à lieu la lipodation co-translationnelle de la protéine apoB sous l'action de la protéine microsomale de transfert de triglycérides (MTP) (Figure 26) (Shelness and Sellers, 2001). La lipodation d'apoB est indispensable à son repliement correct et empêche sa dégradation par le protéasome. Au cours de cette étape, les LD joueraient un rôle crucial en apportant les TG nécessaires à la lipodation d'apoB. Les TG des LD cytosoliques seraient extraits par lipolyse puis de nouveau estérifiés pour former le cœur de la lipoprotéine en cours de synthèse (Ohsaki et al., 2009; Olofsson et al., 2009). La MTP permet également la formation de LD dans la lumière du RE. Celles-ci seraient également impliquées au cours de la morphogenèse des VLDL pour fournir les TG nécessaires, soit indirectement, sous le contrôle d'apoE et de la triacylglycérol hydrolase (TGH) (Wang et al., 2007), soit directement, en fusionnant avec la pré-VLDL formée (Shelness and Sellers, 2001; Olofsson et al., 2009). Cette étape de fusion pourrait avoir lieu dans le RE ou dans un compartiment plus tardif (Figure 26). Un argument en faveur d'une implication importante des LD dans l'assemblage des VLDL est l'observation de structures en croissant, correspondant à des LD en interaction étroite avec un croissant de RE positif pour la protéine apoB (Ohsaki et al., 2009). Le degré de maturation des VLDL est variable, aboutissant à la sécrétion de deux types de VLDL : les VLDL1 et les VLDL2, plus petites, plus denses, moins riches en TG et possédant une plus grande durée de vie dans l'organisme.

### 3.2.4.4 Recyclage des résidus lipoprotéiques

Suite à l'action prolongée de la lipoprotéine lipase (LPL) et/ou de la lipase hépatique (HL) sur les chylomicrons, les VLDL et les IDL, ces lipoprotéines deviennent suffisamment petites pour franchir l'endothélium sinusoidal et pénétrer dans l'espace de Disse où elles sont séquestrées par les molécules d'héparane sulfate (HSPG) (Cohen, 2009; Bassendine et al., 2011). A la surface des hépatocytes, le récepteur aux LDL est capable d'interagir avec les lipoprotéines, principalement via apoE. ApoB100 interagit également avec le LDLR, mais l'affinité de cette interaction est beaucoup moins importante. Par contre, apoB48 est dépourvue du domaine d'interaction avec le LDLR. L'endocytose des résidus de chylomicrons et de VLDL, mais aussi l'endocytose des IDL, s'effectue ainsi via la reconnaissance d'apoE à leur surface, par le LDLR ou par un récepteur apparenté, LRP1, tous deux exprimés à la surface des hépatocytes (Figure 24) (Cohen, 2009; Bassendine et al., 2011). Les résidus lipoprotéiques sont ainsi éliminés rapidement de la circulation, possédant une demi-vie d'environ 30 min. Par contre, les LDL, dépourvues d'apoE, possèdent une demi-vie beaucoup plus longue (de 2 à 4 jours). Elles peuvent tout de même interagir avec le LDLR via apoB100 pour être éliminées.

*In fine*, la liaison des lipoprotéines au LDLR entraîne l'endocytose clathrine-dépendante du récepteur et la dégradation des lipoprotéines associées, libérant ainsi du cholestérol non estérifié. L'apport de cholestérol intracellulaire a plusieurs effets métaboliques. Tout d'abord, il inhibe la synthèse *de novo* de cholestérol. De plus, il active l'acétyl-CoA acyltransférase (ACAT), permettant d'augmenter l'estérification et le stockage du cholestérol. Enfin, il entraîne une diminution de l'expression du LDLR, diminuant d'autant l'apport de cholestérol (Cohen, 2009).



**Figure 26.** Morphogenèse hépatique des VLDL.

La protéine apoB en cours de synthèse est chargée en triglycérides (TG) et en esters de cholestérol (CE) grâce à la protéine microsomale de transfert de triglycérides (MTP), formant ainsi une pré-VLDL dans la lumière du réticulum endoplasmique (RE). ApoB non associée à des lipides neutres est dégradée par le protéasome. La formation de LD luminales dans le RE requiert également l'intervention de la MTP, voire d'apoE. Elles permettraient de fournir les TG nécessaires à la lipidation d'apoB et des pré-VLDL, ainsi que l'acquisition d'apoE. Les VLDL2 ainsi formées sont exportées directement ou enrichies en lipides neutres par fusion avec une LD luminaire, dans le RE ou dans un compartiment en aval de la voie de synthèse. L'assemblage de LD cytosoliques résultant de la fusion de LD formées à la membrane du RE permet d'apporter les stocks de lipides neutres nécessaires à la formation des LD luminales et à l'assemblage des VLDL. (Adapté de Olofsson et al., 2009)

### 3.3 Altérations hépatiques viro-induites

L'expression des différentes protéines virales et l'infection chronique des hépatocytes par HCV ne sont pas sans conséquences sur la physiologie hépatique, contribuant ainsi au développement d'une hépatite et à son évolution vers la fibrose, la cirrhose, voire le carcinome hépatocellulaire. Ces altérations de la physiologie hépatique incluent une augmentation du stress oxydant, un stress du réticulum endoplasmique, des dysfonctions mitochondriales, une induction de l'autophagie et des dérégulations du métabolisme gluco-lipidique (Sheikh et al., 2008; Koike et al., 2010; Woodhouse et al., 2010). Toutes ces altérations sont interdépendantes et participent à la pathogenèse virale, conduisant notamment au développement d'une stéatose, d'une fibrose, voire d'un carcinome (Levrero, 2006).

#### 3.3.1 Stress oxydant, mitochondrie et réticulum endoplasmique

Les patients infectés par HCV présentent un stress oxydant, en relation directe avec l'infection virale (Serejo et al., 2003; Choi and Ou, 2006; Wang and Weinman, 2006). En effet, le niveau de

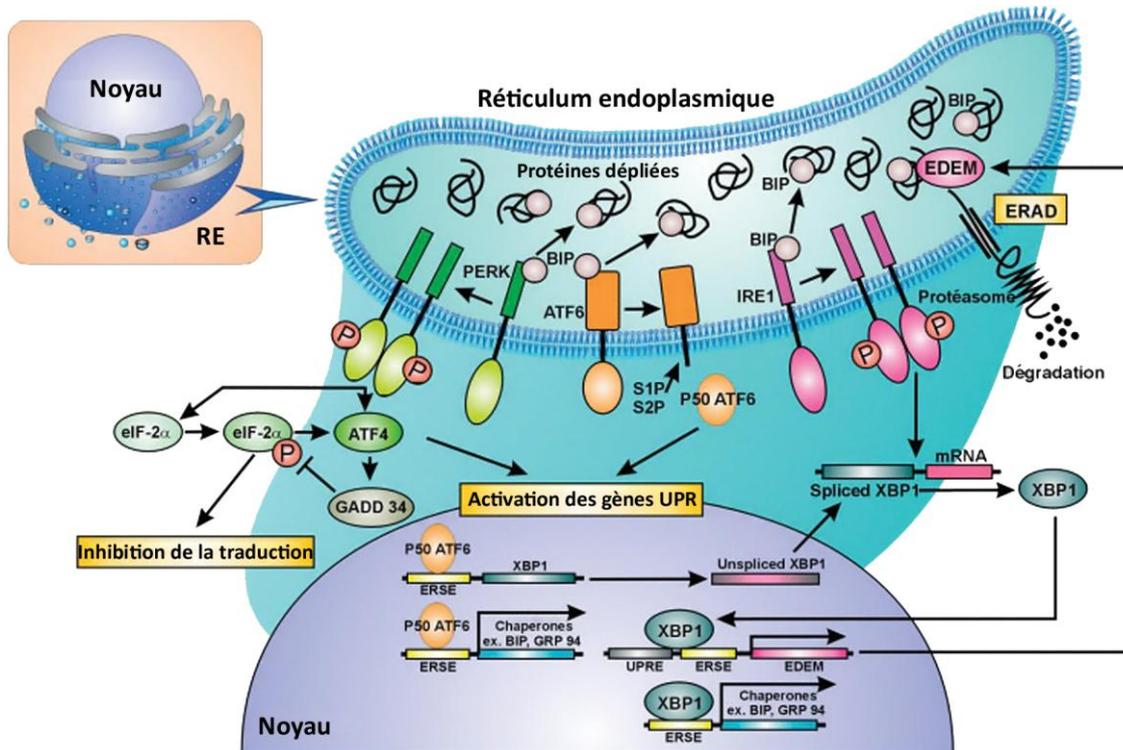
stress oxydant chez des patients asymptomatiques au cours d'une étude longitudinale se révèle prédictif d'une remontée des ALT en relation avec l'infection virale (Vendemiale et al., 2001), et un faible stress oxydant semble prédictif d'une réponse virologique rapide (RVR) suite à l'administration de la thérapie standard pegIFN/ribavirine (Angelico et al., 2009). De plus, il semblerait que le degré de stress oxydant observé chez des patients de génotype 1b soit dépendant de la séquence de la protéine core, une substitution de la leucine en position 91 par une méthionine étant responsable d'une augmentation de la concentration en 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine (un produit d'oxydation de l'ADN) dans le sang et dans l'urine des patients (Tachi et al., 2010). Des études *in vitro* ont permis de déterminer que les protéines virales core et NS5A seraient responsables de ce stress oxydant (Okuda et al., 2002; Dionisio et al., 2009). De manière surprenante, l'induction de ce stress oxydant et la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) en résultant semblent délétères à la réplication virale (Yano et al., 2009). En effet, l'état oxydant généré par l'expression des protéines virales activerait la kinase régulée par les signaux extracellulaires (ERK) qui inhiberait alors la réplication virale par un mécanisme non caractérisé.

La protéine core est capable d'interagir avec la membrane mitochondriale (Okuda et al., 2002; Wang et al., 2010b), d'interagir avec une protéine chaperon mitochondriale (la prohibitine) et d'induire son expression (Tsutsumi et al., 2009). Ces interactions entraîneraient une perturbation de la chaîne respiratoire mitochondriale (complexe I) et une modification de la perméabilité de la membrane mitochondriale conduisant à une augmentation de la production de ROS. Les protéines core et NS5A ont toutes deux été impliquées dans une altération de l'homéostasie calcique des hépatocytes via l'induction d'un stress oxydant (Dionisio et al., 2009). L'accumulation excessive d'ions  $Ca^{2+}$  dans le cytoplasme pourrait notamment être à l'origine d'une augmentation de la perméabilité mitochondriale entraînant notamment une production de ROS plus importante et la libération de cytochrome C pro-apoptotique (Okuda et al., 2002). Il est important de noter qu'il existe une interdépendance entre stress oxydant et stress du RE. En effet, l'abondance de ROS générés par la mitochondrie interfère avec la synthèse et le repliement des protéines au niveau du réticulum, entraînant l'apparition d'un stress du RE. Des ions  $Ca^{2+}$  sont alors libérés par le RE dont l'intégrité est compromise et vont entraîner une perméabilisation de la mitochondrie et une augmentation de la production de ROS (Malhotra and Kaufman, 2007).

### **3.3.2 Stress du réticulum endoplasmique et autophagie**

Un stress du RE a été observé en culture cellulaire, suite à l'infection d'hépatocytes (Merquiol et al., 2011), mais également *in vivo* chez des souris transgéniques (Merquiol et al., 2011) ou des souris humanisées répliquant HCV (Joyce et al., 2009), de même que chez les patients atteints d'hépatite C chronique (Asselah et al., 2010). Il se caractérise par une réponse cellulaire aux protéines mal conformées/repliées, la réponse UPR. Les acteurs et le déroulement de la réponse UPR sont détaillés dans la Figure 27 (Asselah et al., 2010). La réplication virale conduit au développement d'un stress chronique du RE avec un pic d'activation de la réponse UPR *in vitro* dans les jours qui suivent l'infection, mais persistance d'une activité résiduelle jusqu'à plus de 2 semaines après infection. Ce stress chronique entraîne une adaptation cellulaire avec une réponse moindre du système UPR (Merquiol et al., 2011). Cette adaptation semble directement imputable à HCV, puisque la suppression de la réplication virale par traitement IFN restaure la sensibilité de la réponse UPR. De concert avec le stress oxydant viro-induit, le stress du RE serait responsable *in vivo* d'une sensibilisation des hépatocytes à l'apoptose, notamment via l'activation de la protéine pro-apoptotique Bax (Joyce et al., 2009). Cependant, le rôle de l'apoptose au cours de l'infection virale

reste très discuté. L'apoptose pourrait avoir un rôle important dans l'élimination des hépatocytes infectés par le système immunitaire, et/ou représenter un élément critique dans la pathogenèse du HCV, facilitant la régénération hépatique et, à terme, le développement de la fibrose (Fischer et al., 2007).

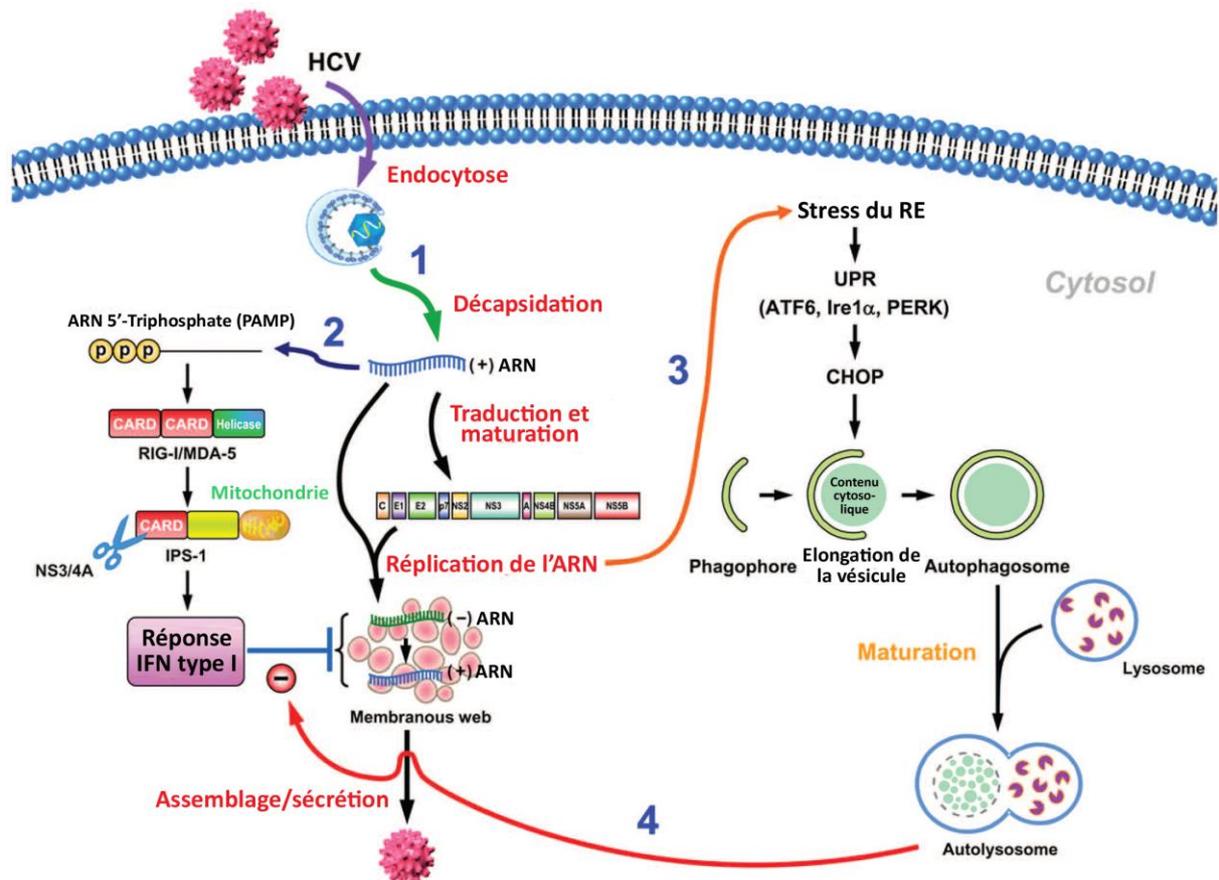


**Figure 27.** Déroulement de la réponse aux protéines mal conformées (UPR).

La protéine chaperon BiP est capable de reconnaître les protéines dépliées ou mal conformées. BiP interagit avec les trois senseurs PERK (kinase du RE similaire à PKR), ATF6 (facteur de transcription activateur 6) et IRE1 (enzyme 1 nécessitant l'inositol) et entraîne leur inactivation. En cas de stress du RE (accumulation de protéines mal conformées), BiP se détache des senseurs, entraînant leur dimérisation et leur activation. PERK phosphoryle eIF2α, ce qui inhibe la traduction cellulaire et induit la traduction spécifique de certains gènes comme ATF4 (facteur de transcription activateur 4), responsable d'un rétrocontrôle négatif via GADD34. L'activation d'ATF6 conduit à son clivage par les protéases S1P/S2P, l'entrée du fragment clivé dans le noyau et l'induction de l'expression de XBP1 (protéine 1 de liaison aux X-box) et des gènes cibles de la réponse UPR. L'épissage de l'ARN XBP1 est catalysé par le troisième senseur, IRE1, qui permet la synthèse de la protéine XBP1, responsable de l'expression des gènes induits par le stress du RE : des chaperons et des protéines impliquées dans le processus de dégradation associée au RE (ERAD) permettant une élimination des protéines mal conformées en collaboration avec le protéasome. (Extrait de Asselah et al., 2010)

En plus de sa participation au développement d'un stress oxydant, notamment via la libération de  $Ca^{2+}$  dans le cytoplasme, le stress du RE a également été impliqué dans une induction de l'apoptose, et plus récemment, de l'autophagie (Høyer-Hansen and Jäättelä, 2007). Les trois voies de réponse au stress du RE ( $Ca^{2+}$ , UPR, ERAD) semblent responsables d'une induction de la formation d'autophagosomes, avec notamment conjugaison de la protéine LC3-I cytosolique (chaîne légère de

la protéine 1 associée aux microtubules) à la phosphatidyléthanolamine (PE), formant ainsi la protéine LC3-II associée aux membranes et impliquée dans l'autophagie (Høyer-Hansen and Jäättelä, 2007). Il été montré que l'expression des glycoprotéines d'enveloppe et la réplication du HCV entraînent un stress du RE avec induction du facteur de transcription CHOP (Chan and Egan, 2005; Ke and Chen, 2011a). Une étude récente place ce facteur de transcription au centre de l'activation de l'autophagie par la réponse UPR dans le cadre de l'infection virale (Figure 28) (Ke and Chen, 2011a). L'autophagie induite par HCV (Ait-Goughoulte et al., 2008; Dreux et al., 2009a) pourrait être induite par l'accumulation des protéines d'enveloppe dans le RE (Chan and Egan, 2005), mais aussi par les protéines non structurales (Chu et al., 2011).



**Figure 28.** Implications du stress du RE et de l'autophagie dans l'immunité antivirale.

L'entrée du virus permet la traduction des protéines virales et la réplication du génome viral au niveau du "membranous web" (1). L'ARN viral (PAMP) est reconnu par les senseurs cellulaires (PRR) RIG-I et/ou MDA-5 (2), qui sont alors recrutés par IPS-1 au niveau de la mitochondrie, conduisant *in fine* à la mise en place d'une réponse IFN. La réplication virale et l'accumulation des protéines virales induit un stress du RE et une réponse UPR, avec, entre autres, l'expression de la protéine CHOP impliquée dans la formation et la maturation des autophagosomes (3). L'activation de l'autophagie permettrait de contrer la réponse IFN et l'immunité innée induite par la réplication virale (4), favorisant la biogenèse de l'ARN viral et la persistance du virus. (Extrait de Ke and Chen, 2011b)

Les déterminants moléculaires conduisant à l'induction de l'autophagie par HCV et le rôle exact de l'autophagie au cours du cycle viral et de l'histoire naturelle de l'infection *in vivo* reste encore à élucider. Il semblerait néanmoins que le virus induise une autophagie incomplète, inhibant la fusion

entre autophagosomes et lysosomes (Sir et al., 2008a). Ceci pourrait expliquer l'abondance de vésicules autophagiques retrouvées dans les hépatocytes infectés *in vitro* comme *in vivo* (Rautou et al., 2011) et pourrait avoir un impact sur la pathogenèse virale (Sir et al., 2008b). Elle serait indispensable à la réplication virale (Sir et al., 2008a) et impliquée dans plusieurs aspects du cycle viral. En effet, elle serait impliquée dans une régulation de l'immunité innée puisqu'elle permettrait au virus d'échapper à son activité antivirale en inhibant la signalisation des IFN de type I (Figure 28) (Estrabaud et al., 2011; Ke and Chen, 2011a). De plus, une étude récente suggère que l'autophagie viro-induite permettrait de dégrader sélectivement des lipides, majoritairement des esters de cholestérol, accumulés à cause des changements métaboliques viro-induits. L'inhibition du processus autophagique entraînerait une augmentation de la stéatose cellulaire induite par le virus, *in vitro* comme *in vivo*, puisqu'une corrélation inverse entre autophagie et stéatose micro-vésiculaire a été retrouvée sur des biopsies hépatiques (Vescovo et al., 2012). Le mauvais fonctionnement de l'autophagie chez les patients infectés aurait donc un impact important sur la pathogenèse, favorisant le développement d'une stéatose hépatique.

### **3.3.3 Métabolisme lipidique et stéatose**

L'infection par HCV est caractérisée par le développement fréquent d'une stéatose hépatique chez les patients (cf. §1.3.2.1). Cette stéatose est fréquemment associée à une résistance à l'insuline, plus marquée dans le cas d'une infection avec un virus de génotype 3, et pourrait jouer un rôle important dans la pathogenèse virale (Figure 6) (Fartoux et al., 2005; Negro, 2010). Cette stéatose a également été associée à une hypobétalipoprotéïnémie, c'est-à-dire à un défaut de sécrétion de VLDL (Serfaty et al., 2001). Des études *in vitro* ou en modèle murin ont permis d'identifier la protéine virale core comme un acteur essentiel de la reprogrammation du métabolisme lipidique de la cellule hôte, conduisant, entre autres, au développement d'une stéatose.

Tout d'abord, la surexpression de la protéine core dans le foie de souris transgéniques entraînerait une diminution de la sécrétion de VLDL via l'inhibition de l'activité de la MTP et serait ainsi responsable du développement d'une stéatose suite à l'accumulation intracellulaire de triglycérides non sécrétés (Perlemuter et al., 2002). L'implication de la MTP dans la stéatose hépatique induite par le virus a également été vérifiée chez les patients infectés (Mirandola et al., 2006). D'autre part, l'interaction entre la protéine core et les LD jouerait un rôle crucial dans la régulation du métabolisme lipidique cellulaire (Roingeard and Hourieux, 2008). En effet, l'enzyme DGAT1 (diacylglycérol acyltransférase 1), qui est nécessaire à la localisation de core à la surface des LD (cf. §4.4.2), est indispensable au développement de la stéatose induite par la protéine core en souris transgénique (Harris et al., 2011). L'association de la protéine core aux LD provoquerait une diminution de leur mobilité et de leur renouvellement, impliquée dans l'accumulation de triglycérides et l'apparition de la stéatose (Harris et al., 2011). Il est intéressant de noter que l'impact de la protéine core sur la morphologie et l'abondance des LD, et ainsi sur la stéatose, est variable en fonction du génotype viral. *In vitro* comme *in vivo*, le génotype 3 est associé avec une importante stéatose, retrouvée plus rarement avec le génotype 1. En effet, la protéine core de génotype 3a est capable d'induire une augmentation significative du volume total et de la taille des LD (Hourieux et al., 2007; Piodi et al., 2008; Clément et al., 2011). L'induction d'une stéatose accrue par la protéine core de génotype 3 a notamment été attribuée à un polymorphisme en position 164, responsable d'une plus forte accumulation des LD (Hourieux et al., 2007). La protéine core de génotype 3a induirait une diminution de l'expression de deux protéines cellulaires, l'homologue de phosphatase et de tensine supprimé sur le chromosome 10 (PTEN) et le substrat du récepteur à l'insuline IRS-1,

entraînant ainsi l'accumulation de triglycérides et l'augmentation de taille des LD (Clément et al., 2011). Un rôle supplémentaire de la protéine core a été décrit dans la littérature. Elle serait capable d'induire l'expression et l'activité du facteur de transcription SREBP-1 (protéine de liaison aux éléments de régulation des stérols), permettant ainsi une expression accrue de l'enzyme de synthèse d'acides gras FAS et une accumulation intracellulaire de lipides (Jackel-Cram et al., 2007, 2010). Dans ces études, l'impact des protéines core de génotype 3a est beaucoup plus marqué que pour les protéines core de génotype 1, impliquant de réelles différences dans la physiopathologie de la stéatose viro-induite en fonction du génotype. Néanmoins, l'analyse de l'incidence de la stéatose chez des patients infectés par un virus de génotype 1b révèle l'existence d'une association entre une mutation de la protéine core à l'acide aminé en position 70 et le développement d'une stéatose hépatique (Tachi et al., 2010), confirmant *in vivo* l'importance de la protéine core dans la stéatose observée, même pour d'autres génotypes que le génotype 3.

D'autre part, la protéine virale core semble impliquée dans le phénomène de résistance à l'insuline hépatique puisque son expression entraîne la phosphorylation d'IRS-1 et son inactivation, rendant la cellule insensible à une stimulation par l'insuline (Banerjee et al., 2008). Les autres facteurs cellulaires dérégulés par l'expression de la protéine virale core sont, entre autres, le récepteur  $\alpha$  au rétinol X (RXR $\alpha$ ) dont l'activité transcriptionnelle est augmentée (Tsutsumi et al., 2002), et le récepteur PPAR $\alpha$  dont l'expression est diminuée *in vitro* (Yamaguchi et al., 2005) comme *in vivo* (Dharancy et al., 2005). Finalement, la protéine core induit à elle seule : une diminution de l'expression et de l'activité de la MTP ; une augmentation de l'expression et de l'activité de SREBP-1 et RXR $\alpha$  qui sont impliqués dans la régulation de la lipogenèse ; une diminution de l'expression de PPAR $\alpha$  régulant l'oxydation métabolique des acides gras ; et une augmentation de la résistance à l'insuline. Ces actions combinées entraînent *in fine* le développement d'une stéatose hépatique (Negro, 2010).

### **3.3.4 Fibrose et carcinome hépatocellulaire**

L'infection par HCV est une des causes principales conduisant au développement d'une fibrose hépatique, mais aussi d'un carcinome hépatocellulaire (HCC) dans les pays occidentaux. Chez les patients chroniquement infectés par HCV, l'émergence d'un HCC est typiquement observée dans un contexte cirrhotique (McGivern and Lemon, 2011). L'apparition et l'évolution de la fibrose et du HCC sont principalement causées par la combinaison de facteurs environnementaux, épigénétiques et génétiques, résultant indirectement de la réplication virale. En effet, l'hépatite C chronique (CHC) est accompagnée d'une réponse immunitaire chronique entraînant une inflammation continue du foie, la destruction répétée des hépatocytes infectés, et la régénération du tissu hépatique lésé, responsable d'une perturbation de l'homéostasie hépatique favorisant l'apparition de HCC. Cependant, l'incidence accrue de la fibrose et du HCC en cas d'infection par HCV, ainsi que l'existence de rares cas de HCC se développant dans un contexte non fibrotique et non inflammatoire, laisse penser à l'existence d'un lien direct entre la réplication virale et la carcinogenèse hépatique (McGivern and Lemon, 2011). Ainsi, une étude récente réalisée *in vitro* suggère que la production de ROS suite à l'infection virale entraînerait l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B via diverses voies de signalisation cellulaire dont la voie de la kinase régulée par les signaux extracellulaires ERK citée précédemment. NF- $\kappa$ B ainsi activé induirait l'expression et la sécrétion de TGF- $\beta$  qui joue un rôle important au cours de la fibrogenèse hépatique (Lin et al., 2010). Une fois encore, la protéine core semble être un déterminant important de la progression de la fibrose et du développement d'un carcinome hépatocellulaire puisque certaines mutations semblent associées avec un risque

accru de carcinogénèse *in vivo* (Nakamoto et al., 2010). La réplication virale semble également réguler directement l'expression de nombreux gènes impliqués dans la carcinogénèse, tels que les suppresseurs de tumeur Rb, p53 et ATM, ou moduler l'activité de diverses voies de signalisation, telles que la voie Wnt/ $\beta$ -caténine ou celle du TGF- $\beta$  (McGivern and Lemon, 2011).

Finalement, comme nous l'avons décrit précédemment, les interactions entre réplication virale (notamment expression de la protéine core), stress oxydant, métabolisme lipidique et immunité antivirale forment un réseau complexe qui oriente la progression de l'hépatite chronique avec développement d'une stéatose, d'une fibrose, et/ou d'un carcinome (Figure 6) (Bartosch et al., 2009; Koike et al., 2010; McGivern and Lemon, 2011).

## 4 Structure et composition des particules virales

### 4.1 Hétérogénéité de la population virale *in vivo*

L'isolation et la purification des particules virales du HCV issues de patients posent un problème technique majeur et constituent un frein à la détermination de la structure et de la composition des particules virales du HCV. En effet, la charge virale des patients infectés est généralement faible (souvent inférieure à  $10^6$  génomes/mL), ce qui complique l'isolation et la purification des particules virales. Ces difficultés techniques résultent aussi d'une forte hétérogénéité structurale des virions circulants. Néanmoins, certaines études *in vivo* ont permis de dresser un portrait approximatif de la morphologie et de la composition des différentes particules virales ou sous-virales qui circulent dans le sang des patients infectés.

La première observation en microscopie électronique d'une particule virale HCV a été réalisée en 1993 à partir de 720 mL de plasma contenant une forte concentration en protéine virale core. Les auteurs ont identifié après ultracentrifugation sur gradient de bromure de potassium une fraction enrichie en protéine core et en ARN viral, à une densité de 1,115 g/mL (Alter and Shih, 1993). Un traitement des particules concentrées dans cette fraction avec un détergent a permis de libérer des particules icosaédriques de 33 nm de diamètre, réagissant avec un anticorps dirigé contre la protéine de capsid, et observables en microscopie électronique. D'après ces auteurs, il s'agirait de la nucléocapside virale composée de la protéine core et de l'ARN viral et possédant une taille avoisinant 33 nm (Alter and Shih, 1993). La première observation potentielle d'une particule virale complète a été réalisée en 1994 à partir de plasmas possédant un fort titre en ARN viral. Des particules virales d'un diamètre compris entre 55 et 65 nm, possédant des extensions en pointe et reconnues par des anticorps polyclonaux et monoclonaux dirigés contre l'enveloppe putative du HCV ont été observées dans les fractions de densité 1,14 à 1,16 g/mL d'un gradient de sucrose (Kaito et al., 1994). Ces observations ont été confirmées et approfondies plus récemment, montrant l'existence de particules virales enveloppées dites "canoniques" à une densité comprise entre 1,14 et 1,20 g/mL (Figure 29) (Petit et al., 2005). Une détermination plus approfondie de la densité des particules virales réalisée sur plus de patients a permis l'isolation de 2 populations particulières différentes : une première population virale, possédant une densité relativement faible comprise entre 1,08 et 1,11 g/mL, est observée chez les patients présentant peu de signes cliniques de l'infection, et pourrait correspondre aux particules virales enveloppées canoniques ; alors que la seconde population, plus dense (entre 1,22 et 1,25 g/mL), serait observée chez les patients présentant des signes cliniques plus avancés et

correspondrait à des nucléocapsides viraux non enveloppés ou à des complexes immuns contenant le virus (Kanto et al., 1994, 1995). L'existence de ces deux populations viraux semble corrélée à leur association aux immunoglobulines du patient et à leur infectivité *in vivo*. En effet, les fractions de forte densité qui sont associées aux immunoglobulines semblent moins infectieuses (Hijikata et al., 1993). De plus, l'existence de nucléocapsides non enveloppés chez les patients présentant une CHC a été confirmée et étudiée plus en détail par d'autres laboratoires. Ces particules présentant une forte hétérogénéité de taille (entre 38 et 63 nm) ne sont pas ou très peu infectieuses, mais pourraient contribuer à la persistance et à la pathogénèse du HCV (Figure 29) (Maillard et al., 2001).

Une dernière catégorie de particules viraux a été identifiée dans le sérum des patients. Il s'agit de particules possédant une densité plus faible, c'est-à-dire inférieure à 1,08 g/mL (Thomssen et al., 1992, 1993). Ces particules viraux peu structurées sont particulièrement infectieuses, contiennent la nucléocapside virale, la glycoprotéine d'enveloppe gpE2, et semblent associées aux lipoprotéines de type LDL et VLDL (Figure 29) (André et al., 2002; Nielsen et al., 2006). Nous reviendrons en détail sur cette association dans le paragraphe suivant.

Les virions HCV circulants présentent ainsi une grande variabilité morphogénétique avec 3 populations viraux majoritaires : des nucléocapsides non enveloppés possédant une densité supérieure à 1,20 g/mL, des virions "canoniques" possédant une densité moyenne de 1,15 g/mL et composés de la nucléocapside virale entourée par une enveloppe lipidique peu structurée contenant les glycoprotéines d'enveloppe viraux, et enfin des particules de faible densité (inférieure à 1,08 g/mL) résultant d'une association entre les lipoprotéines LDL et/ou VLDL et les particules viraux. Comme nous avons pu le voir, la densité et la proportion de ces populations viraux varient beaucoup entre patients, en fonction de l'évolution de l'hépatite, mais d'importantes variations à court terme sont également observées chez un même patient. En effet, l'apport lipidique du régime alimentaire a un impact postprandial sur la densité des particules viraux circulantes (Felmlee et al., 2010), suggérant que, dans le cas du HCV, on soit confronté à une population virale possédant une densité variable mais continue, plutôt qu'à plusieurs populations distinctes possédant des densités discrètes comme c'est le cas pour de nombreux autres virus.

#### **4.2 Association entre HCV et les lipoprotéines *in vivo***

L'association du HCV avec les lipoprotéines de l'hôte a tout d'abord été décrite par Thomssen et collaborateurs en 1992. D'après cette étude, la totalité de l'ARN viral présent dans les fractions de faible densité (entre 1,03 et 1,08 g/mL) peut être immunoprécipité à l'aide d'anticorps anti- $\beta$ -lipoprotéines, c'est-à-dire des anticorps polyclonaux dirigés contre les LDL et les VLDL (Thomssen et al., 1992), suggérant une association étroite entre l'ARN viral et les lipoprotéines de faible densité de l'hôte. Une étude ultérieure du même auteur a montré que l'ARN viral pouvait être indifféremment associé ou non à des lipoprotéines et/ou à des immunoglobulines (IgG). La densité variable des particules viraux pourrait ainsi être expliquée par leur association variable aux lipoprotéines et aux IgG (Thomssen et al., 1993). Un argument supplémentaire en faveur de l'existence d'une association étroite entre l'ARN du HCV et les lipoprotéines est apporté par l'incubation des particules viraux avec une lipoprotéine lipase (LPL). Ce traitement enzymatique entraîne une dégradation partielle de l'ARN viral, suggérant que la LPL est capable de perturber la structure de la particule virale et d'exposer l'ARN viral aux RNases présentes dans le milieu réactionnel (Thomssen and Bonk, 2002).

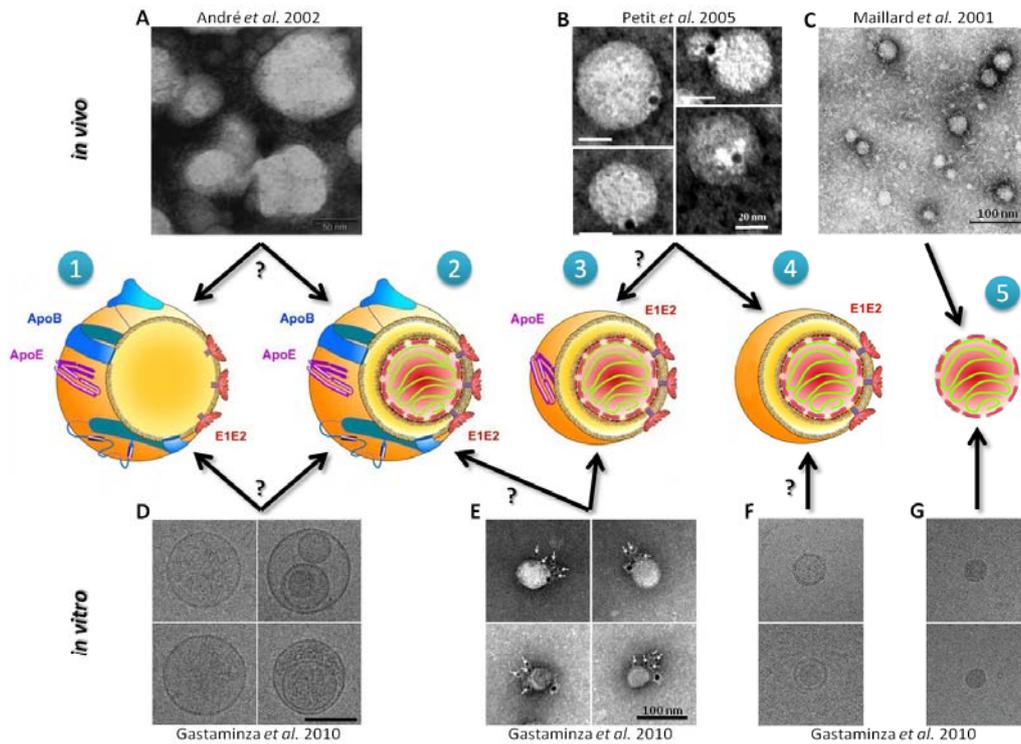
En 2002, André et son équipe ont réalisé, à partir de quelques prélèvements de patients, une caractérisation des particules de faible et de très faible densité contenant l'ARN du HCV. Ils ont

notamment isolé des particules virales de faible densité sur la base de leur association aux immunoglobulines (IgG et IgM) de l'hôte. Ces complexes immuns sont en effet vraisemblablement constitués par des anticorps spécifiques d'antigènes viraux, permettant une concentration des protéines virales dans les échantillons analysés. Ces particules isolées par immunopurification contiennent l'ARN viral mais également les protéines core et apoB. Elles ont donc été baptisées lipoviro-particules (LVP) (André et al., 2002). Ces LVP présentent une structure hétérogène semblable à celle des LDL (ou des VLDL) (Figure 29) et leur délipidation permet de libérer des nucléocapsides positives pour l'antigène core. Une étude ultérieure a également montré que ces LVP sont des particules riches en triglycérides contenant apoB mais aussi les apolipoprotéines échangeables apoE, apoCII et apoCIII. Pour ce qui est des constituants viraux, ces LVP sont positives pour l'ARN viral, la protéine core et les glycoprotéines gpE1 et gpE2 (André et al., 2002; Diaz et al., 2006). Cependant aucune démonstration formelle ne localise tous ces constituants sur une particule unique et il se pourrait que ces LVP soient hétérogènes avec différentes populations particulières.

Parallèlement, Nielsen et collaborateurs ont étudié l'association entre HCV et les (V)LDL à l'aide de gradients de densité d'iodixanol, un composé qui permet une meilleure préservation des particules lipidiques de très faible densité. En étudiant le sérum d'un unique patient, ils ont pu montrer que l'ARN viral de ce patient pouvait être immunoprécipité à plus de 90 % par des anticorps dirigés contre apoB et apoE, suggérant l'existence chez ce patient de particules virales hybrides associées aux (V)LDL (Nielsen et al., 2006). L'association du HCV avec les lipoprotéines de l'hôte semble avoir un rôle important au cours de l'infection, permettant notamment un échappement aux anticorps neutralisants. En effet, il a été montré que l'interaction des virions sériques avec le récepteur cellulaire SR-BI et leur internalisation semble dépendre des  $\beta$ -lipoprotéines mais pas de la protéine gpE2 et de sa région HVR1 (Maillard et al., 2006). Il est intéressant de noter que dans cette étude, l'inhibition de l'interaction avec SR-BI a été obtenue avec des anticorps polyclonaux anti- $\beta$ -lipoprotéines, partiellement avec des anticorps monoclonaux anti-apoE et pas du tout avec des anticorps anti-apoB, suggérant une plus forte association avec apoE.

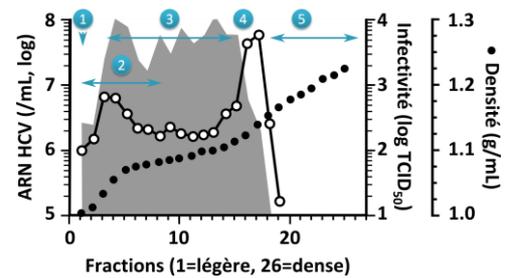
Récemment, une caractérisation plus approfondie de la composition des LVP par le groupe de Patrice André a permis de déterminer précisément leur nature (Scholtes et al., 2012). Bien qu'il existe de fortes variations interindividuelles, en moyenne seulement 1/3 des ARN viraux serait associé aux fractions de faible densité, les LVP présentes dans ces fractions contiennent les apolipoprotéines apoB, apoE, apoCI, apoCII et apoCIII, mais pas apoAII (spécifique des HDL), le génome viral et la protéine virale gpE2. Ces LVP ont une composition en phospholipides proche de celle des lipoprotéines classiques, intermédiaire entre celle des VLDL et celle des IDL. Cependant, ces LVP possèdent beaucoup plus d'apoB que d'ARN viral (en moyenne  $10^6$  fois plus), suggérant que la plupart de ces LVP seraient des particules sous-virales défectives qui ne contiendraient que les glycoprotéines d'enveloppe, et seraient dépourvues de nucléocapside virale (Scholtes et al., 2012). Ces particules ne contenant que les protéines d'enveloppe virales pourraient jouer un rôle important en détournant les anticorps neutralisants produits par l'hôte.

En conclusion, les particules virales produites *in vivo* sont très variables et encore mal caractérisées. Leur association aux lipoprotéines de type VLDL et LDL semble avérée, mais les modalités de cette association restent encore très mal comprises et des études supplémentaires sont nécessaires. En particulier, il serait intéressant de pouvoir produire ces LVP *in vitro*, en quantités suffisantes pour permettre leur caractérisation biochimique (composition) et biophysique (structure).



**Figure 29.** Structure et composition des particules virales observées *in vivo* et *in vitro*.

(A-C) Observations en microscopie électronique de particules virales sériques provenant de patients. (D-G) Observations en microscopie électronique de particules virales produites en culture cellulaire. (A) Lipo-viro-particules (LVP) purifiées montrant des structures internes (André et al., 2002). (B) Particules virales enveloppées "canoniques" marquées avec un anticorps anti-gpE2 (Petit et al., 2005). (C) Nucléocapsides non enveloppées de forte densité (Maillard et al., 2001). (D) Grosses vésicules et corps multivésiculaires pouvant correspondre à des LVP. (E) Particules virales enveloppées marquées pour gpE2 (flèches) et apoE (billes d'or non fléchées). (F) Particules virales enveloppées observées en cryo-microscopie électronique. (G) Nucléocapsides non enveloppées observées en cryo-microscopie électronique (Gastaminza et al., 2010).



Les particules (1) et (2) correspondraient aux LVP observées *in vivo*, de faible densité, la majorité d'entre elles étant dépourvues de la nucléocapside virale et constituant des particules sous-virales défectives (1). Les particules virales (3) et (4), contenant ou non apoE seraient les particules virales enveloppées canoniques du HCV. Celles-ci pourraient également contenir apoB (2) et auraient une densité variable. Les nucléocapsides non enveloppées sont également schématisées (5). La répartition de l'ARN viral et de l'infectivité dans un gradient de densité (Lindenbach et al., 2005) est également représentée avec la position des différentes particules virales présentées ci-dessus.

### 4.3 Structure et composition du HCV *in vitro*

Depuis le développement d'un modèle d'étude du HCV *in vitro* en 2005 (Lindenbach et al., 2005; Wakita et al., 2005; Zhong et al., 2005), il est devenu possible d'observer et d'étudier la morphologie et la composition des particules virales sécrétées en culture cellulaire. A l'instar des

observations faites chez les patients, la répartition de l'ARN viral en gradients de densité semble assez peu discrète puisqu'on retrouverait de l'ARN depuis les densités les plus faibles, jusqu'à des densités proches de 1,2 g/mL (Lindenbach et al., 2005). Cependant, contrairement à ce qui peut être observé chez certains patients, la majorité de l'ARN viral est retrouvée entre 1,10 et 1,15 g/mL (Figure 29), et il semblerait qu'il n'y ait pas de nucléocapsides non enveloppées possédant une densité supérieure à 1,22 g/mL (Wakita et al., 2005; Zhong et al., 2005). Il est intéressant de noter qu'en culture cellulaire, les particules virales les plus infectieuses sont également d'une densité plus faible que la densité attendue pour des particules enveloppées canoniques. En effet, la majorité des particules virales infectieuses possède une densité comprise entre 1,03 et 1,12 g/mL (Figure 29) (Lindenbach et al., 2005; Zhong et al., 2005). Ces particules de faible densité possèdent un pouvoir fusogène plus élevé, probablement du fait de leur composition lipidique différente (Haid et al., 2009). La densité de ces particules virales sécrétées en culture cellulaire a été récemment vérifiée sur des hépatocytes primaires humains infectés avec HCV (Podevin et al., 2010). Lindenbach et collaborateurs ont réalisé en 2006 une expérience intéressante dans laquelle ils ont infecté des chimpanzés avec des virions produits en culture cellulaire (HCVcc). Ils ont pu observer que la réplication du virus chez les chimpanzés entraînait une diminution de la densité des particules virales sécrétées, diminution qui était abolie lors de la réinfection de cellules avec le sérum des chimpanzés infectés (Lindenbach et al., 2006). Cette étude suggère l'existence d'une différence entre culture cellulaire et études *in vivo* puisque l'utilisation d'une même souche virale aboutit à la production de particules virales distinctes.

Grâce aux forts taux de réplication et de production de particules virales obtenus avec la souche utilisée en culture cellulaire, il est possible d'étudier un détail la sécrétion de virions et leur morphologie. Ainsi, dès 2005, Wakita et son équipe ont pu observer en microscopie électronique des particules virales enveloppées canoniques d'une densité moyenne de 1,15 g/mL, d'un diamètre moyen de 55 nm, et possédant à leur surface les glycoprotéines d'enveloppe virales (Wakita et al., 2005). Cependant, comparativement à de nombreux virus, la quantité de virions sécrétée est relativement faible (seulement  $10^4$  à  $10^5$  particules infectieuses par mL, contre plus de  $10^8$  pour HBV par exemple), rendant toute observation en microscopie électronique difficile. Néanmoins, en utilisant des souches virales modifiées permettant une plus forte production de particules et en concentrant les virions obtenus, deux études récentes ont pu caractériser de manière plus détaillée la structure du HCV produit *in vitro* (Gastaminza et al., 2010; Merz et al., 2011). Ces deux études ont permis l'observation de particules enveloppées canoniques d'un diamètre moyen de 60 nm, positives pour gpE2 et pour apoE (Figure 29). La première étude, réalisée en cryo-microscopie électronique a permis de mettre en évidence 3 populations virales de morphologies différentes : des particules non enveloppées d'un diamètre moyen de 44 nm, des particules enveloppées canoniques et des particules de faible densité (grosses vésicules ou corps multivésiculaires) d'un diamètre moyen de 100 nm, mais qui contribuent peu à l'infectivité (Gastaminza et al., 2010). La nature exacte (virale ou non) de ces particules de faible densité reste encore à déterminer, mais semble contraster avec les observations qui ont été faites *in vivo*.

Outre l'étude morphologique des particules virales, de nombreux efforts ont été réalisés ces dernières années pour comprendre la composition de ces particules, et tout particulièrement leur association aux facteurs de l'hôte tels que les lipoprotéines. Concernant leur composition lipidique, l'analyse de particules virales produites *in vitro* révèle une composition proche de celle des lipoprotéines et non de celle des membranes cellulaires comme c'est le cas pour d'autres virus (Merz

et al., 2011). Ainsi, à l'instar de ce qui est observé chez les patients, il semblerait qu'il existe une association étroite entre les lipoprotéines de l'hôte et la particule virale. Concernant leur composition protéique, une approche protéomique sur des virions produits en culture cellulaire et hautement purifiés a permis d'identifier une quarantaine de protéines de l'hôte, incluant la protéine de choc thermique HSC70, comme des constituants de la particule virale (Parent et al., 2009). La protéine HSC70 embarquée à la surface de la particule interagit avec gpE2, joue un rôle important au cours de l'assemblage des virions et semble également présente à la surface des particules virales de patients. L'inhibition de l'expression et/ou de l'activité de la protéine HSC70 permet de diminuer la réplication du HCV *in vitro* (Parent et al., 2009; Peng et al., 2010b). Parmi les autres protéines de l'hôte associées aux virions, on retrouve des apolipoprotéines. Comme *in vivo*, apoC1 est présente sur la particule virale. Elle jouerait un rôle important au cours de l'entrée virale et de l'interaction avec l'héparane sulfate (Meunier et al., 2008). De manière plus surprenante, une étude récente démontre que HCV, *in vivo* comme *in vitro*, entraîne une association plus importante d'apoA1 avec les LDL, et que cette apolipoprotéine est requise *in vitro* pour la réplication et la production du virus (Mancone et al., 2011).

L'association entre apoE et les particules virales est quant à elle unanimement admise. Elle a été observée par immunomarquage en microscopie électronique (Gastaminza et al., 2010; Merz et al., 2011) et par immunoprecipitation de l'ARN viral en utilisant des anticorps monoclonaux spécifiques d'apoE (Chang et al., 2007; Owen et al., 2009; Hishiki et al., 2010). De plus, l'utilisation d'anticorps anti-apoE (Chang et al., 2007; Jiang and Luo, 2009; Owen et al., 2009; Mazumdar et al., 2011) ou de fragments peptidiques d'apoE (Liu et al., 2012) permet d'inhiber efficacement l'infection virale, suggérant un rôle fonctionnel d'apoE au cours de l'entrée virale *in vitro*. Il a en effet été suggéré qu'apoE pourrait faciliter l'entrée virale par son interaction avec le récepteur aux LDL (Owen et al., 2009). Ce rôle d'apoE dans l'entrée serait dépendant de son interaction avec la glycoprotéine d'enveloppe gpE1 (Mazumdar et al., 2011). Il est intéressant de noter que le rôle d'apoE dans l'infectivité des particules virales semble dépendre des isoformes d'apoE étudiées (apoE2, E3 et E4), ce qui pourrait avoir des conséquences au niveau clinique en fonction du génotype des patients (Hishiki et al., 2010). En plus de son importance concernant l'entrée des particules HCV, apoE est indispensable à l'assemblage et la sécrétion de particules virales, comme nous allons le voir dans le prochain paragraphe (Chang et al., 2007; Jiang and Luo, 2009; Benga et al., 2010; Cun et al., 2010). L'existence d'une association entre HCV et apoB *in vitro* est un sujet beaucoup plus polémique. En effet, une publication fait état d'une association par co-immunoprecipitation entre apoB et un composant viral (à savoir la protéine core) mais n'apporte pas de quantification (Nahmias et al., 2008). Deux autres études font état d'une neutralisation partielle de l'infection (jusqu'à 50% seulement) en présence d'anticorps anti-apoB (Akazawa et al., 2011; Mazumdar et al., 2011). Cependant, d'autres auteurs ont été dans l'incapacité de retrouver une association significative d'apoB avec les particules virales (Owen et al., 2009; Merz et al., 2011) où une neutralisation de l'infectivité avec des anticorps dirigés contre apoB (Jiang and Luo, 2009; Owen et al., 2009). Pour finir, le dernier argument en faveur de l'association du HCV avec les lipoprotéines de l'hôte provient de l'étude du rôle de la lipoprotéine lipase (LPL). En effet, l'incubation des virions avec la LPL entraîne une diminution de l'entrée virale et de l'infection due à deux mécanismes distincts : d'une part la dégradation partielle des particules virales suite à la lipolyse (Shimizu et al., 2010; Maillard et al., 2011) et d'autre part la rétention des particules à la surface cellulaire inhibant l'entrée virale (Maillard et al., 2011).

En conclusion, les particules HCV produites en culture cellulaire sont tout aussi diverses et complexes que celles retrouvées chez les patients, même si peu ou pas de particules de faible densité associées à apoB sont produites *in vitro*. La réconciliation des données cliniques et expérimentales nous permet de proposer un modèle de particule virale infectieuse présentant une association forte aux lipoprotéines de l'hôte (Figure 29). Cette association se traduit par une composition lipidique unique se rapprochant de celle des (V)LDL et par la présence d'apolipoprotéines telles qu'apoE, apoC1, et potentiellement d'autres apolipoprotéines. Ces particules virales portent également à leur surface des protéines de l'hôte jouant un rôle important au cours de la morphogenèse. Ainsi, la présence d'HSC70 a été démontrée, mais d'autres protéines virales ou cellulaires pourraient être également présentes. Finalement, l'hétérogénéité de densité observée pourrait correspondre à des variations de la lipidation des particules sécrétées, comme c'est le cas en fonction du régime alimentaire des patients infectés (Felmlee et al., 2010).

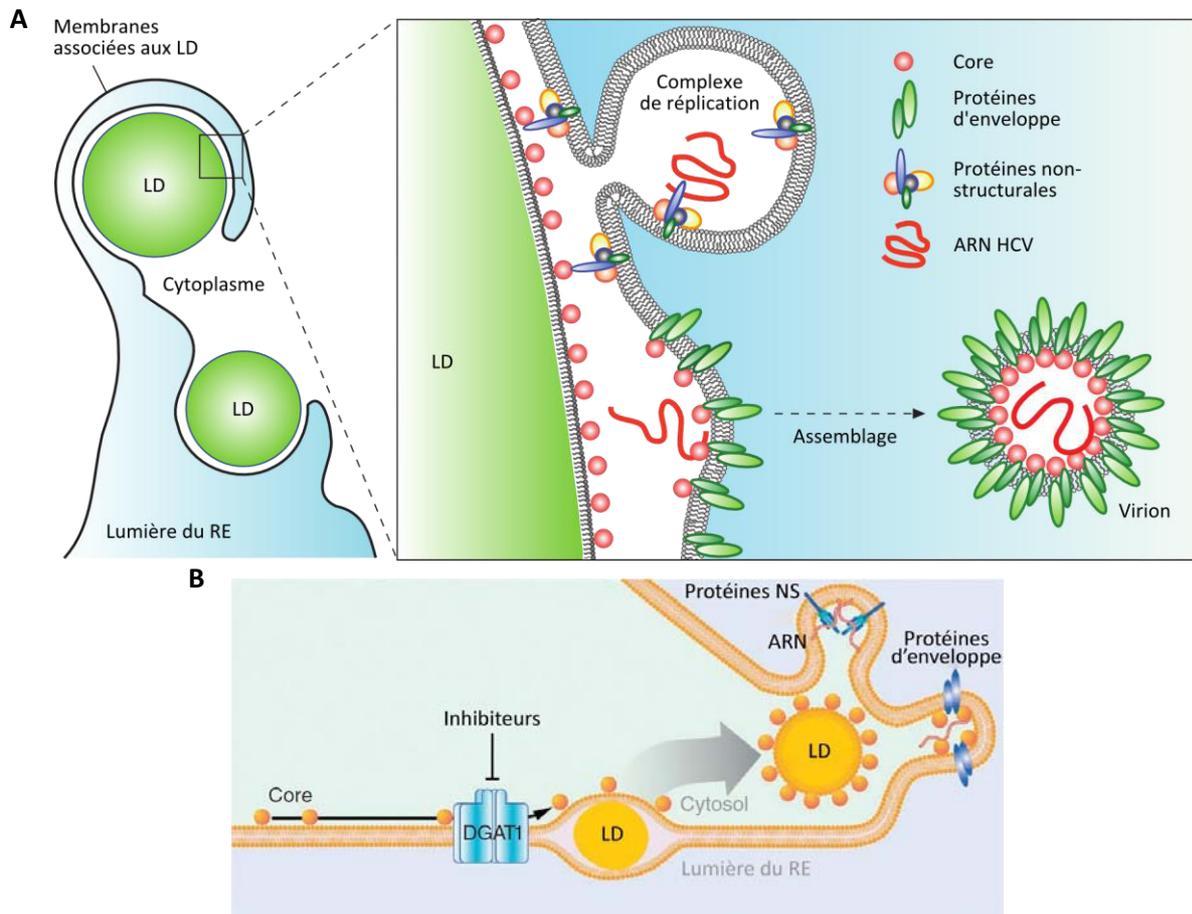
#### **4.4 Assemblage et sécrétion des particules virales**

Les dernières étapes du cycle viral, qui permettent la production de particules virales infectieuses et la propagation de l'infection d'une cellule à l'autre et d'un organisme à l'autre sont les étapes d'assemblage et de sécrétion des virions néosynthétisés (Figure 14). Depuis le développement du modèle HCVcc en 2005, permettant l'établissement d'un cycle viral complet en culture cellulaire, de nombreuses études ont été entreprises pour essayer de mieux comprendre la morphogenèse des particules virales, étape qui n'était jusqu'alors que très peu étudiée.

##### **4.4.1 Assemblage de la nucléocapside**

L'assemblage de la nucléocapside est un événement important de la morphogenèse virale. L'étude de cet assemblage a été réalisée dans un premier temps en exprimant les protéines virales structurales dans des cellules BHK-21 (fibroblastes de rein de hamster) à l'aide d'un réplicon Semliki Forest Virus (SFV) (Blanchard et al., 2003). Ce système permet la formation de Virus-Like Particules (VLP) contenant la protéine core du HCV. Les auteurs ont ainsi pu déterminer que la protéine virale core joue un rôle essentiel dans la formation de la nucléocapside virale, notamment via l'acide aspartique situé en position 111 au sein du domaine responsable des interactions homotypiques (Figure 13) (Blanchard et al., 2003). La maturation de la protéine core via l'action de la signal peptide peptidase (SPP) est également requise pour la formation des VLP (Ait-Goughoulte et al., 2006). De plus, des études de l'auto-assemblage de la nucléocapside *in vitro* en utilisant une protéine core et des ARNt purifiés a permis de déterminer que le domaine 2 C-terminal de la protéine, contenant le domaine d'association aux membranes et aux gouttelettes lipidiques (LD), ne semble pas requis pour l'assemblage de la nucléocapside (Majeau et al., 2004). Il semblerait que la multimérisation de la protéine core commence dès la synthèse de la protéine et avant sa maturation. Elle s'associe de manière concomitante avec le RE grâce à la séquence signal présente en C-terminal et le clivage de cette dernière par la SPP permettrait un enveloppement membrane des multimères capsidiques un niveau du réticulum (Ai et al., 2009). Ces événements permettent la formation de nucléocapsides virales suite au recrutement de l'ARN viral par le domaine 1 de la protéine de capsid. Cependant, ils ne sont pas suffisants à la formation de particules virales infectieuses. En effet, le domaine 2 de la protéine core qui permet son association aux LD (Hope and McLauchlan, 2000; Boulant et al., 2006) est indispensable à la production de particules virales infectieuses (Boulant et al., 2007; Miyanari et al., 2007; Shavinskaya et al., 2007), comme nous allons le voir ci-dessous. Dans ce contexte, il a été récemment montré que la palmitoylation de la protéine core au niveau de sa cystéine 172

C-terminale était importante pour la production de virions HCV (Majeau et al., 2009). Elle serait impliquée dans un recrutement de la protéine de capsid au niveau du RE lisse, à proximité des LD, permettant ainsi l'assemblage final de la nucléocapside dans la lumière du RE.



**Figure 30.** Rôle des gouttelettes lipidiques dans l'assemblage du HCV.

(A) Modèle pour la production de particules virales HCV infectieuses. La protéine core à la surface des gouttelettes lipidiques (LD) interagit avec les protéines non structurales à la surface du RE (notamment avec NS5A), permettant le recrutement des complexes de réplication membranaires. Les glycoprotéines d'enveloppe sont également présentes à la surface du RE et permettent l'assemblage des nouveaux virions et leur libération dans la lumière du RE. (Extrait de Miyanari et al., 2007)

(B) Rôle des LD et de la diacylglycérol transférase (DGAT1) au cours de l'assemblage. L'activité de la DGAT1 qui permet la formation des LD à partir du RE est requise pour l'association de la protéine virale core aux LD, cette association étant nécessaire pour l'assemblage viral. (Extrait de Herker et al., 2010)

#### 4.4.2 Implication des gouttelettes lipidiques

Comme nous l'avons vu précédemment, l'expression de la protéine virale core dans des cellules en culture induit une accumulation de triglycérides accompagnée d'une augmentation de la taille des LD (Piodi et al., 2008; Harris et al., 2011). La protéine core affecte également la localisation et la mobilité des LD : elles deviennent moins mobiles (Lyn et al., 2010) et se regroupent autour du noyau cellulaire (Depla et al., 2010). Une redistribution des LD est également observée dans les

hépatocytes infectés *in vitro*. Celle-ci serait dépendante des microtubules et de la dynéine et résulterait d'un déplacement préférentiel des LD vers le centre organisateur des microtubules (MTOC) suite au remplacement de la protéine ADRP associée aux LD par la protéine virale core (Boulant et al., 2008). Ce regroupement des LD pourrait être nécessaire à l'assemblage, en favorisant les interactions entre les LD décorées par la protéine core et les sites de réplication associés au RE. Un second mécanisme permettant le regroupement périnucléaire des LD a été proposé et consisterait en une résorption des LD distales associées au RE et décorées de la protéine cellulaire ADRP, suivie d'une formation de nouvelles LD déclenchée par la protéine core présente à la surface du RE et à proximité des complexes de réplication viraux (Roingeard and Depla, 2011). Quoiqu'il en soit, les LD semblent importantes pour la production de particules virales, étant donné que la formation de VLP en cellules BHK-21 (Roingeard et al., 2008) ou la formation de particules virales complètes en système infectieux (Miyanari et al., 2007) ont été observées par microscopie électronique au sein du RE, immédiatement à proximité des LD. Une étude complète réalisée par Miyanari et collaborateurs en 2007 démontre le rôle des LD dans la production virale comme plateforme d'assemblage. En effet, la localisation de la protéine core à la surface des LD semble nécessaire au recrutement des autres protéines non structurales virales au niveau des LD *via* son interaction avec NS5A. Ceci aurait pour conséquence de rapprocher les complexes de réplication réticulaires des LD et permettrait ainsi la morphogénèse virale (Figure 30) (Miyanari et al., 2007). L'interaction avec les LD ne semble pas nécessaire à la sécrétion de la nucléocapside virale, mais à la sécrétion de particules virales infectieuses en culture cellulaire. Récemment, la diacylglycérol acyltransférase 1 (DGAT1), une enzyme de synthèse des triglycérides, a été identifiée comme requise pour la production de particules virales infectieuses. Il existe 2 DGAT différentes, localisées à la surface du RE (DGAT1) ou des LD (DGAT2). De manière surprenante, seule DGAT1 semble impliquée dans la production de particules virales infectieuses. Elle serait nécessaire au transfert de la protéine core à la surface des LD en cours de synthèse et ainsi aux étapes décrites ci-dessus (Figure 30) (Herker et al., 2010).

#### **4.4.3 Rôle du couple p7/NS2**

La viroporine p7 et une partie de la protéine non structurale NS2 ne sont pas directement impliquées dans la réplication de l'ARN viral. Il semblerait par contre qu'elles aient toutes deux un rôle important au cours de l'assemblage et de la maturation des particules virales infectieuses. En effet, il a été démontré que la suppression de la protéine p7 ou l'inactivation de son activité de canal ionique entraîne une diminution drastique de la production de particules virales infectieuses (Jones et al., 2007; Brohm et al., 2009). Cette viroporine serait impliquée dans la prévention de l'acidification des compartiments cellulaires normalement acides (notamment les lysosomes) en jouant un rôle de perméase à protons. Ceci pourrait permettre de protéger les virions en cours de maturation qui sont beaucoup plus sensibles aux faibles pH que les virions matures (Wozniak et al., 2010). La protéine NS2 est également requise pour l'assemblage des virions HCV. Son domaine protéasique est requis, mais son activité protéase est dispensable, suggérant un rôle de la protéine dans des interactions intermoléculaires au cours de l'assemblage (Jones et al., 2007; Jirasko et al., 2008). La protéine NS2 est capable d'interagir physiquement avec les protéines virales E2, p7, NS3 et dans une moindre mesure NS5A, suggérant un rôle de cette protéine dans le recrutement des protéines structurales et non structurales autour des LD permettant d'initier l'assemblage viral (Jirasko et al., 2010; Ma et al., 2011; Popescu et al., 2011). En effet, les mutants de NS2 abolissant l'assemblage abrogent la colocalisation avec E2 et NS3 à proximité des LD. L'interaction avec p7

pourrait jouer un rôle important dans la topologie de la protéine NS2 et dans son interaction avec les autres protéines virales puisque des mutants de p7 sont capables d'abroger ou de restaurer l'interaction de NS2 avec E2 et NS3 (Jirasko et al., 2010; Ma et al., 2011). L'interaction entre NS2 et p7 pourrait également réguler la localisation subcellulaire de la protéine core et ainsi déclencher l'assemblage viral (Boson et al., 2011). Une étude de la fonction de NS2 par trans-complémentation a récemment suggéré que NS2, de concert avec NS5A, régulerait également la maturation des virions à une étape post-assemblage (Yi et al., 2009).

#### **4.4.4 Rôle des autres protéines non structurales**

Parmi les autres protéines non structurales contribuant à la production de virions infectieux, la protéine NS5A est sans doute la plus importante. Elle permet, via son interaction avec la protéine core, le recrutement des autres protéines non structurales et des complexes de réplication à la périphérie des LD, lieu présumé de l'assemblage des particules virales (Miyanari et al., 2007). Le domaine III de NS5A (Appel et al., 2008; Hughes et al., 2009b) et la région riche en proline située entre les domaines II et III (Hughes et al., 2009a) semblent jouer un rôle particulièrement important au cours de l'assemblage et leur délétion inhibe la colocalisation NS5A-core et augmente la quantité de core à la surface des LD (Appel et al., 2008), suggérant que NS5A favoriserait également le transfert de la protéine core depuis les LD vers les sites d'assemblage réticulaires à proximité. Même si le domaine III de NS5A est une des régions les plus variables du génome viral, il semblerait que sa fonction au cours de l'assemblage soit conservée entre génotypes (Kim et al., 2011b). La protéine non structurale NS3 semble également impliquée au cours de l'assemblage, mais son rôle reste mal compris. Il a été suggéré que NS3 serait impliquée dans une étape précoce précédant la formation de la nucléocapside (Ma et al., 2008), alors qu'une étude plus récente révèle l'existence d'une interaction génétique entre core et NS3 qui indiquerait un rôle plus tardif, postérieur à la formation de la nucléocapside (Jones et al., 2011). Des études récentes ont également suggéré que les protéines NS4B (Jones et al., 2009) et NS5B (Gouklani et al., 2012) pourraient être impliquées dans l'assemblage, cependant leur rôle n'est pas déterminé et la confirmation de ces résultats par d'autres équipes est nécessaire.

#### **4.4.5 Assemblage viral et lipoprotéines**

Un nombre croissant d'études soulignent l'importance de l'assemblage et de la sécrétion des lipoprotéines dans la production de particules virales infectieuses. Il a en effet été démontré que les apolipoprotéines apoB et apoE, ainsi que la protéine microsomale de transfert de triglycérides (MTP), toutes trois impliquées dans la morphogénèse des VLDL, étaient présentes dans les mêmes compartiments membranaires que les protéines virales non structurales (dont NS5A) et que l'ARN viral, suggérant un rôle des lipoprotéines au cours du cycle viral (Huang et al., 2007). De plus, l'utilisation d'inhibiteurs de MTP ou la diminution de l'expression d'apoB par interférence à ARN (RNAi) permettent de diminuer significativement la sécrétion de particules virales infectieuses, sans altérer la réplication de l'ARN viral (Huang et al., 2007; Gastaminza et al., 2008). L'utilisation d'un autre inhibiteur de la sécrétion des VLDL, la naringénine, indépendamment d'une inhibition via la MTP, semble également inhiber la sécrétion virale (Nahmias et al., 2008) via une inhibition de la sécrétion d'apoB. Ces études sont en faveur d'un rôle crucial de la sécrétion de VLDL et plus particulièrement d'apoB au cours de la morphogénèse virale. Parallèlement, d'autres études se sont plus particulièrement intéressées au rôle d'apoE dans l'assemblage viral. Des expériences de suppression de l'expression d'apoE par RNAi ou de surexpression de celle-ci ont permis de montrer que, en plus d'être présent à la surface des particules virales sécrétées, apoE est requise pour la

morphogénèse virale (Chang et al., 2007; Jiang and Luo, 2009). En revanche, une remise en question partielle des résultats obtenus pour apoB est envisageable. En effet, les arguments en faveur d'un rôle d'apoB sont moins tranchés qu'en ce qui concerne apoE et il a été montré que les concentrations d'inhibiteurs de MTP utilisées dans ces études sont trop importantes et diminueraient à la fois l'expression d'apoB et d'apoE. Des analyses réalisées avec des concentrations faibles n'affectant qu'apoB semblent ne pas avoir d'effet sur la sécrétion virale (Jiang and Luo, 2009). Néanmoins, un effet spécifique de la diminution d'expression d'apoB par RNAi a été observé (Huang et al., 2007; Gastaminza et al., 2008). De plus, il a été récemment décrit que la surexpression des glycoprotéines d'enveloppe virales dans divers modèles cellulaires compétents pour la synthèse de lipoprotéines de type VLDL ou chylomicron entraîne la sécrétion de particules hybrides contenant à la fois apoB et les glycoprotéines virales (Icard et al., 2009), renforçant l'hypothèse d'un rôle d'apoB *per se* au cours de la morphogénèse virale. Quant à apoE, son implication fait plus l'unanimité étant donné que son interaction physique avec la protéine NS5A a été décrite par plusieurs groupes et est requise pour l'assemblage de particules virales infectieuses (Benga et al., 2010; Cun et al., 2010). Quoiqu'il en soit, l'activité de MTP au cours de l'assemblage des lipoprotéines semble requise pour la production virale. Étant donné que MTP régule à la fois la lipidation d'apoB en cours de synthèse et la formation des LD présentes dans la lumière du RE (luLD) qui contiendrait apoE, il n'est pas étonnant que les inhibiteurs de MTP influencent à la fois l'expression d'apoB et d'apoE. HCV pourrait utiliser soit l'une, soit l'autre de ces apolipoprotéines, soit les deux pour son assemblage et sa sécrétion (Figure 31).

#### **4.4.6 Divers acteurs cellulaires impliqués dans la morphogénèse**

Deux protéines cellulaires impliquées dans la réplication virale ont également été associées à la production de particules virales infectieuses. Il s'agit de l'Annexine A2 (Backes et al., 2010) et de la cyclophiline A (Kaul et al., 2009) qui joueraient un rôle encore mal défini au cours de l'assemblage des particules.

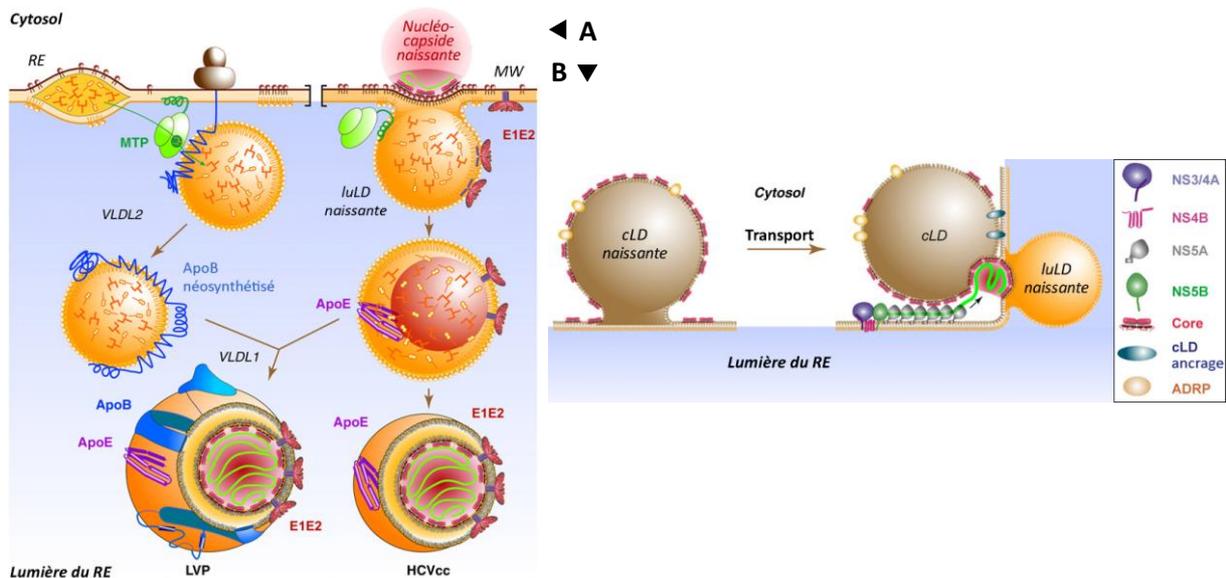
L'assemblage et la maturation des virions est également un processus fortement dépendant du métabolisme lipidique des cellules infectées. Notamment, la maturation virale semble intimement liée à la biogénèse des sphingolipides au niveau du Golgi par les protéines de transfert de céramide (CERT) et de liaison à l'oxystérol (OSBP). En effet, la protéine kinase D (PKD) responsable de leur inactivation par phosphorylation régule négativement la sécrétion virale (Amako et al., 2011). Il est intéressant de noter que les protéines CERT et OSBP nécessaires à la sécrétion virale interagiraient avec les protéines VAP associées aux membranes du RE et potentiellement aux complexes de réplication, permettant ainsi un rapprochement des sites de réplication et de maturation des virions.

#### **4.4.7 Trafic et sécrétion des nouveaux virions**

Une fois assemblées, les particules virales sont transportées vers leurs sites de maturation et sont excrétées hors de la cellule. Les glycanes présents sur les glycoprotéines d'enveloppe à la surface des virions sécrétés sont caractéristiques d'une maturation au niveau du Golgi, suggérant que les particules virales en cours de maturation transitent par le Golgi (Vieyres et al., 2010). Des études en microscopie optique sur cellule vivante ont permis d'étudier le transport et la sécrétion des particules virales après l'assemblage. Ainsi, le transport des virions vers le Golgi puis la membrane cellulaire serait dépendant des microtubules et inhibé par le nocodazole (Counihan et al., 2011; Coller et al., 2012). Il semblerait que la migration des particules virales le long des microtubules soit dépendante d'une interaction entre les protéines NS2 et NS3-4A qui pourrait jouer un rôle dans

l'initiation de l'assemblage (Counihan et al., 2011). La sécrétion des virions utiliserait le réseau trans-golgien (TGN) et les endosomes précoces et tardifs, impliqués dans le recyclage des protéines membranaires (Lai et al., 2010; Coller et al., 2012). Ainsi, la protéine membranaire associée aux vésicules VAMP1 et la protéine Rab11 $\alpha$ , un composant des endosomes de recyclage semblent indispensables au transport post-Golgi de la protéine core après assemblage, et donc des virions néosynthétisés (Coller et al., 2012). Un des acteurs moléculaires impliqués dans le tri vésiculaire des endosomes est le système ESCRT (complexe endosomal de tri requis pour le transport). Il est responsable de la formation des corps multivésiculaires (MVB) et est détourné par de nombreux virus, dont les rétrovirus, pour permettre leur bourgeonnement et leur sécrétion (Martin-Serrano and Neil, 2011). Il semblerait que ce complexe soit également requis pour la sécrétion de particules virales HCV à un stade post-assemblage (Corless et al., 2010; Ariumi et al., 2011), mais son rôle n'est pas encore défini.

Un effort considérable reste encore à accomplir pour éclaircir les processus d'assemblage et de sécrétion du HCV, notamment pour comprendre l'importance relative des tous ces facteurs impliqués ainsi que la séquence des événements nécessaires à la morphogénèse virale, donnant naissance à des particules de nature, de densité et d'infectiosité très variable *in vitro* comme *in vivo*.



**Figure 31.** Morphogénèse hypothétique du HCV.

(A) La morphogénèse des VLDL résulte de la fusion de deux précurseurs, chargés en triglycérides et en esters de cholestérol par la MTP, dont l'un seulement est positif pour apoB (VLDL2). La nucléocapside et les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 du HCV pourraient s'associer au second précurseur dépourvu d'apoB, une LD luminale (luLD). La fusion ou non de ces 2 précurseurs donnerait naissance, respectivement, à des lipo-viro-particules contenant apoB et apoE (LVP), ou à des particules HCVcc contenant uniquement apoE.

(B) Les LD cytosoliques (cLD) décorées par la protéine virale core seraient transportées jusqu'aux sites de réplication virale (membranous web, MW), permettant ainsi l'assemblage de la nucléocapside au niveau de luLD naissantes. Ce processus hypothétique de formation de la nucléocapside et d'assemblage du virion est probable puisqu'aucune énergie supplémentaire ne semble nécessaire pour le transfert de la protéine core sur la luLD.

(Extrait de Bartenschlager et al., 2011)

## 5 Importance des modèles d'étude

Un des freins majeurs à l'avancée de la recherche sur le virus de l'hépatite C est le manque de modèles d'études pertinents et faciles d'accès permettant d'analyser les aspects physiopathologiques mais également les aspects virologiques et moléculaires de l'infection par HCV. En effet, ce virus présente à la fois une spécificité d'hôte restreinte (l'Homme et le Chimpanzé), un fort tropisme hépatocytaire et une faible réplication comparé à d'autres virus. Le développement de modèles d'étude a donc été une étape clé dans la compréhension de l'infection par HCV, comme nous allons le découvrir ci-dessous.

### 5.1 Modèles d'étude *in vivo*

Les modèles *in vivo* capables de supporter une réplication virale et de développer une pathologie en réponse à l'infection sont nécessaires pour comprendre la physiopathologie de l'infection et les déterminants de son évolution chez le patient.

#### 5.1.1 Homme

L'Homme représente un modèle d'étude idéal de l'infection par HCV, reposant sur l'utilisation de prélèvements humains (essentiellement sangs et biopsies hépatiques). Son utilisation est cruciale pour confirmer/infirmes les observations réalisées *in vitro* ou en modèles animaux et valider les concepts proposés. Cependant, l'utilisation du modèle humain est limitée puisqu'aucune expérience pouvant mettre en cause la santé des patients n'est bien sûr envisageable. De plus, l'obtention de prélèvements cliniques devient de plus en plus compliquée, à cause de l'amélioration des techniques de dépistage et de diagnostic, entraînant une diminution importante du nombre de biopsies réalisées. Enfin, l'hétérogénéité des prélèvements, imputable à la variabilité de l'histoire naturelle de l'infection et à l'hétérogénéité des cohortes de patients, ainsi que le faible volume des prélèvements, ne permettant pas la réalisation d'études biochimiques, restreignent d'autant l'utilisation de ceux-ci.

Un modèle intéressant, notamment pour de l'étude de la dynamique précoce d'infection, consiste en l'utilisation de prélèvements cliniques obtenus à l'occasion du développement d'une hépatite récurrente. En effet, la plupart des patients positifs pour HCV et bénéficiant d'une transplantation hépatique subissent une réinfection massive du nouveau greffon (Gane, 2008). La procédure clinique prévoit la réalisation de prélèvements sériés à 1, 3, et 6 mois (voire plus), après transplantation, ce qui permet de suivre la réinfection du greffon. Avec ce type de matériel, il a été possible par exemple de suivre la reprogrammation transcriptionnelle précoce associé à la réinfection et à une progression rapide de la maladie hépatique (Rasmussen et al., 2012), ou encore d'analyser par des approches protéomique et métabolomique les modifications induites par le virus au cours de la réinfection, et ainsi d'identifier des marqueurs précoces permettant de prédire une progression rapide vers la fibrose (Diamond et al., 2012). L'inconvénient majeur de ce dernier modèle est l'utilisation d'immunosuppresseurs chez ces patients, ne permettant pas d'analyser la nature et le rôle de la réponse immunitaire au cours de la pathogenèse virale.

#### 5.1.2 Primates

Le premier modèle animal d'étude du HCV a été utilisé avant même l'identification du virus et a notamment permis l'isolation et le clonage du génome viral (Choo et al., 1989). Il s'agit du Chimpanzé (*Pan troglodytes*), qui peut être infecté par HCV et développer une réaction immunitaire et une hépatite chronique en réponse à l'infection (Bukh, 2004). Cependant, son utilisation est

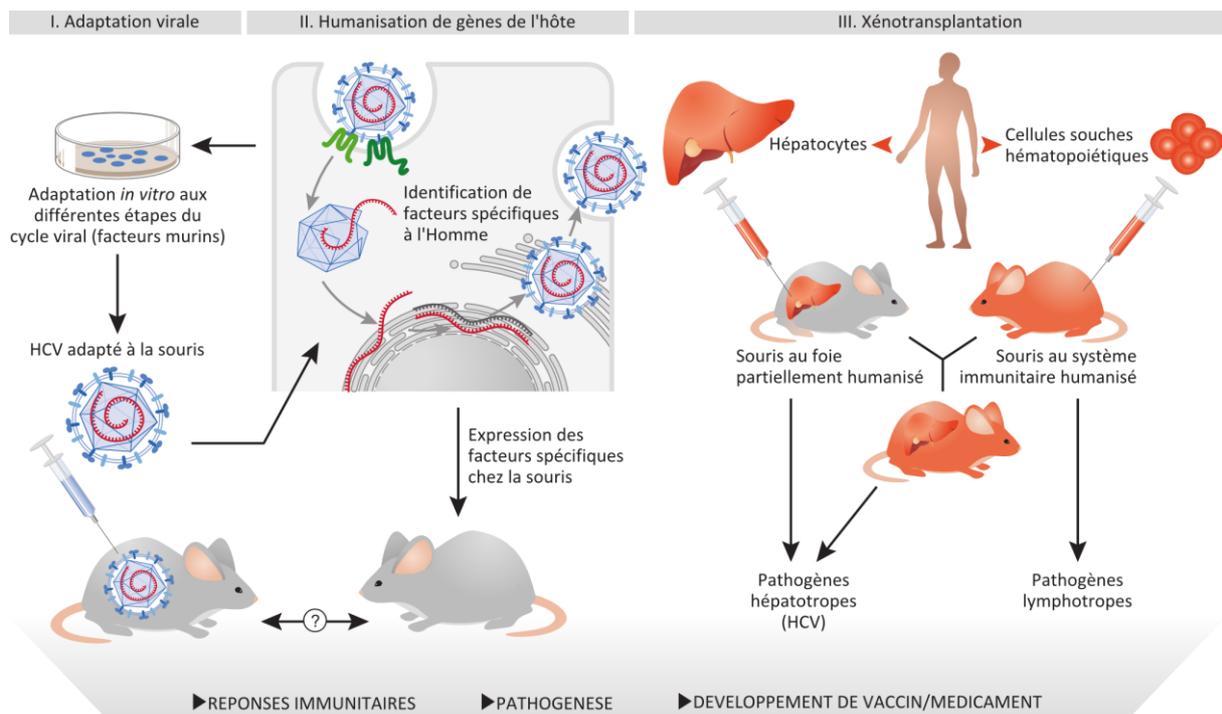
limitée par des considérations éthiques, une disponibilité restreinte, des infrastructures contraignantes et un coût très élevé. De plus, la pertinence de ce modèle semble limitée puisque la fréquence de développement d'une hépatite chronique est moindre, l'hépatite développée est beaucoup moins sévère que chez l'Homme et la réponse immunitaire atténuée (Bassett et al., 1998). Cependant, le chimpanzé reste le seul animal naturellement susceptible à l'infection par HCV et présentant une pathogenèse pouvant se rapprocher de celle observée chez l'Homme, ce qui en a fait un modèle intéressant (Bukh, 2004). Néanmoins, les Etats-Unis restent une des dernières nations mondiales où l'expérimentation sur les chimpanzés reste légale, mais la nouvelle législation prévue risque de fortement réduire l'utilisation de ce modèle dans le futur. Une analyse longitudinale de l'infection HCV dans un nouveau modèle de primate, le *Tupaia belangeri*, a récemment démontré l'existence chez ces primates d'une réplication du HCV transmissible et pouvant conduire au développement d'une pathogenèse chronique hépatique (Amako et al., 2010). Ce petit primate pourrait ainsi constituer un modèle alternatif à l'utilisation des chimpanzés, restant néanmoins un modèle animal peu répandu et difficile d'accès. Le développement de nouveaux modèles animaux prend ainsi toute son importance.

### 5.1.3 Souris

Les souris n'étant pas susceptibles naturellement à l'infection, différents modèles ont été développés pour permettre d'étudier HCV *in vivo*. Les premiers modèles furent l'expression hépatospcifique, conditionnelle ou constitutive de différentes protéines virales ou bien de la polyprotéine virale complète (Lerat et al., 2002) dans des souris transgéniques (Figure 32). Ces modèles ont permis de mieux comprendre certains aspects de la pathogenèse hépatique directement induite par l'expression des protéines virales (Koike et al., 2010). L'induction d'un stress oxydant et la dérégulation du métabolisme lipidique par la protéine virale core ont ainsi pu être confirmés *in vivo* (Koike et al., 2010). Néanmoins, ces modèles restent artificiels et limités par l'absence de réplication virale et de réponse immunitaire associée. D'autres modèles de souris transgéniques exprimant notamment des facteurs humains permettant d'accroître la permissivité des cellules murines à l'infection pourraient être développés. Cependant, un nombre croissant de facteurs expliquant la spécificité d'hôte sont identifiés et complexifient cette approche. Même si l'expression des 4 récepteurs humains SR-BI, CD81, CLDN-1 et OCLN dans des lignées cellulaires murines permettent l'entrée virale (Ploss et al., 2009), leur expression en souris transgénique ne semble pas permettre la réplication du virus, ni même l'entrée dans des hépatocytes primaires, suggérant l'existence de facteurs de restriction ou d'autres facteurs indispensables à l'entrée virale chez la souris (Hikosaka et al., 2011). Néanmoins, une étude récente utilisant une stratégie d'expression des transgènes à l'aide d'une transduction adénovirale a permis d'observer, en modèle murin immunocompétent, une entrée efficace du HCV pouvant être inhibée par des anticorps neutralisants ciblant les glycoprotéines d'enveloppe ou les récepteurs cellulaires (Dorner et al., 2011).

Les modèles murins les plus utilisés actuellement sont les modèles de souris humanisées par la greffe d'hépatocytes humains (Mercer et al., 2001; Meuleman et al., 2005; Azuma et al., 2007). Plusieurs modèles de souris humanisées ont été établis. Le premier repose sur l'utilisation de souris dites uPA-SCID qui présentent une immunodéficiencce combinée sévère (SCID) et surexpriment l'urokinase activateur de plasminogène (uPA) sous le contrôle du promoteur hépato-spécifique de l'albumine. Ce transgène Alb-uPA permet une destruction partielle du foie de la souris qui peut ensuite être recolonisé par les hépatocytes humains greffés. Ces souris possèdent ainsi un foie chimérique comprenant des hépatocytes murins et des hépatocytes humains et peuvent être

infectés par HCV (Mercer et al., 2001; Meuleman et al., 2005). Ce modèle est très utilisé pour l'évaluation des composés antiviraux et du pouvoir neutralisant des anticorps présents chez les patients (Meuleman et al., 2011, 2012). Un second modèle développé plus récemment permet une meilleure repopulation hépatique par les hépatocytes humains. Il s'agit du modèle FRG, basé sur la mutation d'une enzyme hépatique, la fumarylacétoacétate hydrolase (Fah), dans des souris fortement immunodéficientes par inactivation des protéines Rag et IL-2R $\gamma$  (Azuma et al., 2007). Les hépatocytes de ces souris ont besoin d'un médicament pour compenser la déficience de l'enzyme Fah. La suppression de ce traitement, combinée à l'utilisation d'un adénovirus exprimant le transgène uPA, permet d'obtenir jusqu'à 90% de repopulation du foie par des hépatocytes humains (Azuma et al., 2007). Ces souris sont également susceptibles à l'infection par HCV et constituent un nouvel outil pour tester l'efficacité des traitements antiviraux *in vivo* (Bissig et al., 2010). Cependant, il est impossible d'étudier l'immunopathogénèse virale dans ces modèles à cause de l'absence de système immunitaire fonctionnel. Ainsi, récemment, un nouveau modèle de souris, possédant un foie ainsi qu'un système immunitaire humanisés, a été décrit et permettrait d'étudier l'infection virale dans sa globalité, y compris la réponse immunitaire induite par HCV (Washburn et al., 2011).



**Figure 32.** Les différents modèles murins utilisés pour étudier HCV.

On distingue trois stratégies principales pour développer des modèles murins afin d'étudier les réponses immunitaires et la pathogénèse au cours de l'infection HCV. La première consiste à adapter le virus aux homologues murins des protéines impliquées dans le cycle viral (I), la deuxième consiste à adapter les souris en créant des souris transgéniques exprimant les différents facteurs humains nécessaires au cycle viral (II), et la troisième repose sur la création de souris humanisées qui possèdent un foie chimérique contenant à la fois des hépatocytes murins et des hépatocytes humains (III). (Extrait de Ploss and Rice, 2009)

## 5.2 Modèles d'étude *in vitro*

Une grande diversité de modèles d'études *in vitro* a été développée, permettant notamment l'analyse de chacune des étapes du cycle viral. Les systèmes des pseudo-particules virales, par exemple, a permis des avancées importantes dans la découverte des récepteurs et des mécanismes d'entrée du virus. Ce système repose sur la production de particules rétrovirales dont le génome a été remplacé par un gène rapporteur tel que la GFP (permettant d'identifier les cellules infectées), et dont les protéines d'enveloppe ont été remplacées par les glycoprotéines du HCV (Bartosch et al., 2003). L'inconvénient majeur de ce système est la production de particules hybrides entre rétrovirus et HCV, possédant une structure et une composition très différentes des particules virales du HCV (Bonnafeous et al., 2010). Une partie des autres modèles d'étude *in vitro* va être présentée ci-dessous, en relation avec l'étude de deux aspects différents de la réplication virale qui m'ont particulièrement intéressé au cours de mes travaux de thèse.

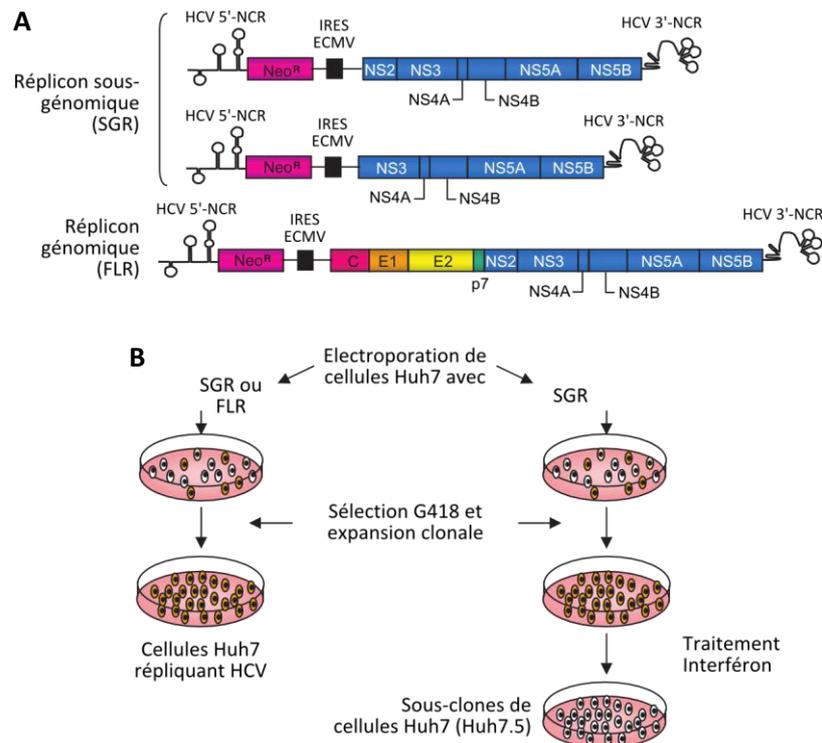
### 5.2.1 Etude des altérations cellulaires viro-induites

A l'instar des autres virus de la famille des *Flaviviridae*, HCV semble induire de nombreuses modifications de l'organisation et de l'ultrastructure cellulaires. Nous allons essayer dans cette partie de comprendre l'impact des systèmes viraux et cellulaires utilisés sur la compréhension des altérations cellulaires viro-induites.

#### 5.2.1.1 Système réplicon et expression inductible

La construction d'un ARN sous-génomique comportant un gène de résistance à la néomycine sous contrôle de l'IRES du HCV et la séquence codant pour les protéines non structurales NS3 à NS5B sous contrôle de l'IRES d'EMCV (virus de l'encéphalomyocardite) a permis pour la première fois la réplication stable de l'ARN viral *in vitro* (Figure 33) (Lohmann et al., 1999). Les séquences virales incorporées dans ce réplicon sous-génomique sont nécessaires et suffisantes à la réplication de l'ARN viral. La sélection de cellules d'hépatocarcinome Huh7 transfectées par ce réplicon sous-génomique à l'aide de l'antibiotique G418 permet d'obtenir une réplication virale persistante en culture en sélectionnant et en amplifiant la sous-population cellulaire qui réplique efficacement l'ARN et exprime ainsi la protéine de résistance à la néomycine (Figure 33). L'élimination du virus dans ces cellules ayant contenu le réplicon sous-génomique (SGR) a permis la sélection de sous-clones particulièrement permissifs pour HCV, dont la lignée Huh7.5 dont nous parlerons plus tard (Blight et al., 2002). Des variantes du réplicon sous-génomique ont été adoptées avec notamment la construction de réplicons génomiques complets (FLR) permettant d'étudier la maturation de la polyprotéine dans son intégralité (Ikeda et al., 2002). Ce système d'étude a permis l'identification du rôle de chacune des protéines non structurales au cours de la réplication de l'ARN ainsi que le développement d'antiviraux à action directe ciblant la protéase virale NS3-4A et la polymérase virale NS5B. Ce système réplicon est encore utilisé aujourd'hui pour déterminer si les effets observés sur le cycle viral sont imputables ou non à un effet sur la réplication de l'ARN *per se*.

L'expression inductible tétracycline-dépendante de la polyprotéine virale (Moradpour et al., 1998) ou de chacune des protéines virales a, quant à elle, permis d'étudier l'influence de l'expression des protéines virales sur la physiologie cellulaire indépendamment de la réplication virale.



**Figure 33.** Le système de répliqueur HCV et son utilisation.

(A) Structures des différents types de répliqueurs autonomes : sous-génomique (avant ou sans NS2) et génomique (séquence codante complète).

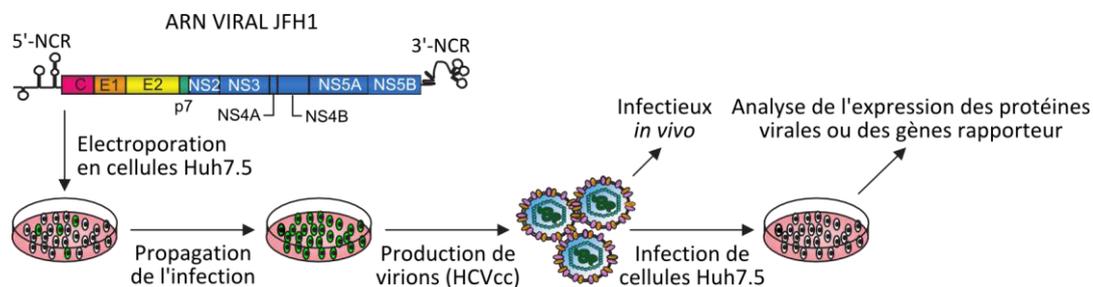
(B) Utilisation des répliqueurs : l'électroporation et la sélection avec la G418 permettent d'obtenir une réplication de l'ARN viral durable en cellules Huh7. L'élimination ultérieure du virus par un traitement interféron permet la sélection de sous-clones cellulaires présentant une permissivité accrue pour HCV, incluant le sous-clone Huh7.5 utilisé pour la réplication du virus complet (voir ci-dessous). (Adapté de Régeard et al., 2007)

#### 5.2.1.2 Systèmes virus complet

En 2001, une souche virale a été isolée chez un patient japonais atteint d'une hépatite C fulminante (Kato et al., 2001). Cette souche de génotype 2a a été nommée JFH1 (Japanese Fulminant Hepatitis 1). Elle a tout d'abord permis la construction d'un répliqueur sous-génomique capable de se répliquer en cellules Huh7. En 2005, l'électroporation du génome ARN complet de la souche JFH1 dans des cellules Huh7 ou dérivées (Huh7.5 et Huh7.5.1) a permis pour la première fois l'établissement d'un cycle complet de réplication virale en culture cellulaire avec production de particules infectieuses *in vitro* (Figure 34) (Lindenbach et al., 2005; Wakita et al., 2005; Zhong et al., 2005). Par opposition aux pseudo-particules virales (HCVpp), le système de réplication du HCV en culture cellulaire a été baptisé HCVcc. Les particules virales produites dans ce système sont également infectieuses *in vivo* puisqu'elles sont capables d'infecter des chimpanzés ou des souris humanisées (Lindenbach et al., 2006). La souche JFH1 a permis le développement d'un tel système répliatif car elle présente une très forte réplication de son génome, pouvant peut-être expliquer la forte virulence observée chez le patient dont elle est issue. La construction de chimères intra-génotypiques possédant les protéines non structurales de JFH1 qui permettent une forte réplication de l'ARN viral et les protéines structurales d'une autre souche virale, J6, ont permis d'améliorer la production et la sécrétion de particules virales infectieuses (Lindenbach et al., 2005). La construction

de chimères inter-génotypiques a également été réalisée avec la souche Con1 notamment (génotype 1b) pour disposer d'un système cellulaire capable de produire des particules virales comprenant des protéines d'autres génotypes (1 à 3) (Pietschmann et al., 2006). La comparaison des séquences de ces constructions avec celles de génomes JFH1 adaptés aux cellules Huh7 par passages successifs a notamment permis d'identifier les acides aminés 172 et 173 dans la protéine core et l'acide aminé 534 dans gpE2 comme des déterminants majeurs de l'infectivité accrue des particules produites par la chimère J6/JFH1 en comparaison des particules JFH1 (Delgrange et al., 2007).

Récemment, un nouveau système de production de particules virales infectieuses ne nécessitant pas la réplication de l'ARN viral a été mis au point. Ce système est basé sur l'utilisation de cellules contenant un replicon sous-génomique du virus West-Nile (WNV) et exprimant la polyprotéine virale HCV sous contrôle d'un promoteur pour la T7 polymérase (Triyatni et al., 2011). Ce nouveau modèle pourrait permettre de découpler réplication et production de particules infectieuses pour mieux comprendre les mécanismes qui régulent cette dernière.



**Figure 34.** Le système réplcatif HCVcc et son utilisation.

L'électroporation du génome complet de la souche JFH1 dans des cellules d'hépatocarcinome permet l'initiation d'un cycle viral productif produisant des particules virales infectieuses *in vitro* comme *in vivo*. (Adapté de Régeard et al., 2007)

### 5.2.1.3 Compréhension de l'impact cellulaire de la réplication virale

Rapidement après le développement du système réplcon, l'expression des protéines virales et la réplication du génome viral ont été associées à des altérations de l'organisation subcellulaire, notamment des membranes cellulaires. Le premier réarrangement membranaire mis en évidence en microscopie électronique consiste en un réseau membranaire complexe composé de multiples vésicules apposées (Figure 35). Ce réseau membranaire, baptisé "membranous web", est induit par l'expression de la polyprotéine virale entière ou de la protéine NS4B seule (Egger et al., 2002). Il serait le siège de la réplication virale puisqu'il contient la plupart des protéines virales non structurales et structurales. Ces observations ont été confirmées ultérieurement en réplcon sous-génomique (Gosert et al., 2003) et en système HCVcc (Rouillé et al., 2006). Des interactions homotypiques entre différents domaines de NS4B semblent indispensables à la formation de ce réseau membranaire complexe et à la réplication de l'ARN viral suggérant que NS4B est capable de former un échafaudage moléculaire nécessaire à la formation des complexes de réplication (Paul et al., 2011). L'activité de la kinase PI4K-III $\alpha$  permettant d'enrichir les membranes à proximité des complexes de réplication en PI4P semble indispensable à la formation du "membranous web" et des complexes de réplication associés (Berger et al., 2009; Reiss et al., 2011; Tai and Salloum, 2011). En plus de ce "membranous web" créé par la protéine NS4B, d'autres structures atypiques ont été identifiées. La protéase NS3-4A serait notamment responsable de la formation et du regroupement

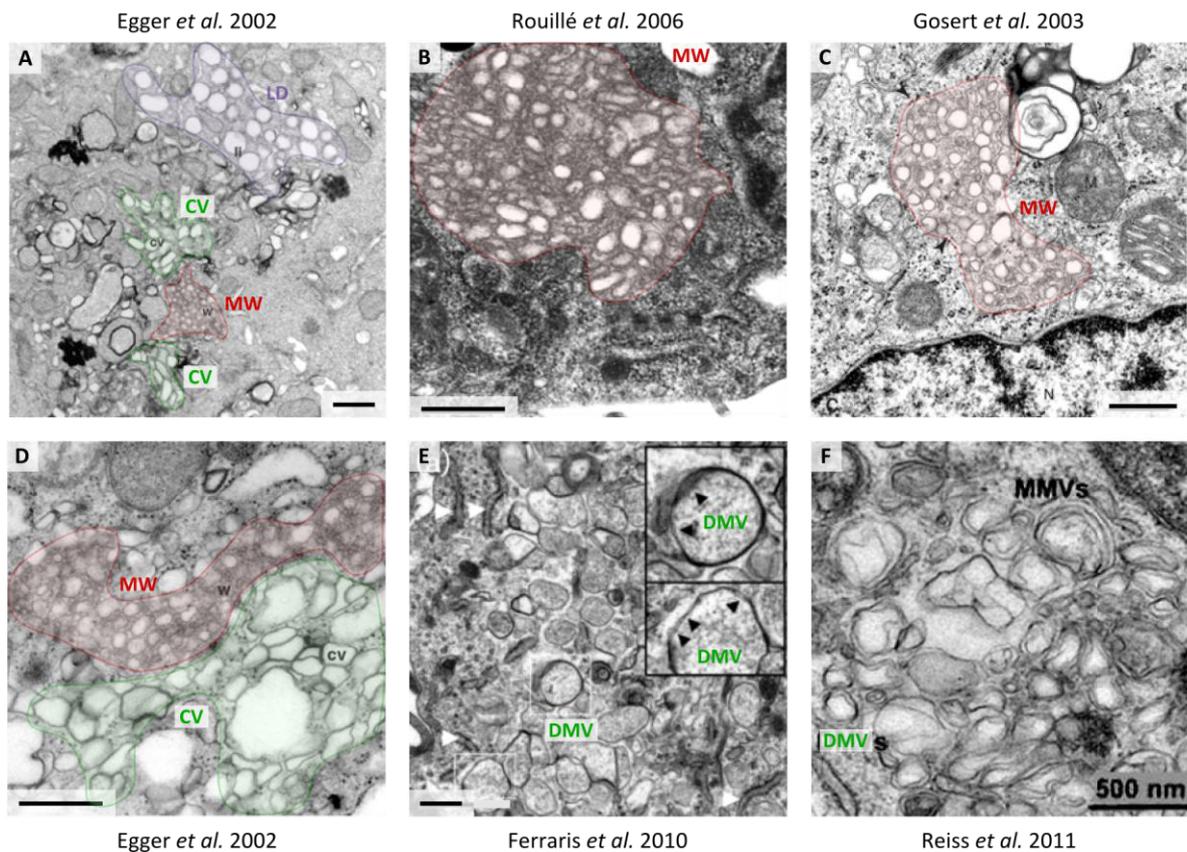
de vésicules lisses contigües dans les systèmes d'expression de la polyprotéine complète (Egger et al., 2002) ou de réplicon sous-génomique (Gosert et al., 2003) (Figure 35). La nature de ces vésicules contigües n'est pas connue, mais il pourrait s'agir de vésicules à double membrane (DMV), qui ont été observées par ailleurs (Ferraris et al., 2010; Reiss et al., 2011). Ces DMV, typiques de l'infection par HCV ont été caractérisées en détail. Elles contiendraient au moins les protéines non structurales NS3 et NS5A et seraient d'origine autophagique, puisqu'elles sont positives pour la protéine LC3-II, un marqueur des autophagosomes (Ferraris et al., 2010). Des vésicules à membranes multiples seraient également retrouvées dans les cellules répliquant HCV. L'observation de ces vésicules va de pair avec une augmentation importante de l'autophagie cellulaire qui a notamment pu être quantifiée par comptage des autophagosomes en microscopie électronique (Chu et al., 2011). HCV induirait ainsi l'autophagie cellulaire (Ait-Goughoulte et al., 2008), permettant de créer les structures membranaires nécessaires à sa réplication (Dreux et al., 2009a; Guévin et al., 2010). L'induction de l'autophagie et l'accumulation de DMV utilisées pour la réplication virale ont été également décrites pour d'autres virus tels que les rotavirus, le virus du syndrome respiratoire aigu sévère (SARS) ou le virus de la dengue (Dreux and Chisari, 2010). Les altérations cellulaires induites par HCV sont donc nombreuses et semblent être fortement impliquées dans la réplication et la propagation du virus.

#### 5.2.1.4 Limites des systèmes actuels

Il est important de considérer les limites des systèmes cellulaires utilisés ci-dessus pour avoir un regard critique sur la pertinence des interprétations biologiques proposées. La surexpression des différentes protéines virales utilisée en dehors de tout contexte réplcatif semble induire des modifications majeures de l'ultrastructure cellulaire. Ainsi, la majorité du cytoplasme subit de profonds remaniements membranaires dans les cellules observées (Figure 35) (Egger et al., 2002; Reiss et al., 2011). L'hypothèse qu'une quantité non physiologique de protéines à la surface de certains compartiments cellulaires puisse induire des structures qui n'ont pas lieu d'être dans un cadre physiologique n'est pas à exclure. Néanmoins, les modifications observées dans un contexte de surexpression protéique semblent également retrouvées, dans une moindre mesure, dans des cellules exprimant un réplicon sous-génomique (Figure 35) (Gosert et al., 2003; Ferraris et al., 2010), mais aussi dans des cellules répliquant la souche virale JFH1 (Rouillé et al., 2006). Ces considérations suggèrent une réelle pertinence des modifications ultrastructurales observées. Cependant, le niveau d'expression des protéines virales semble tout de même jouer un rôle important dans l'intensité des modifications observées. La comparaison de deux études concernant l'implication de la PI4K-III $\alpha$  dans la formation des structures membranaires nécessaires à la réplication virale en est un bon exemple. En effet, ces deux études ont, entre autres, analysé l'impact d'une diminution de l'expression de la PI4K-III $\alpha$  sur les modifications ultrastructurales viro-induites nécessaires à la réplication de l'ARN viral. La première étude, utilisant des cellules Huh7.5 infectées avec un virus J6/JFH1, a montré qu'une diminution de l'expression de la PI4K-III $\alpha$  par interférence à ARN supprimait la formation des structures membranaires viro-induites (appelées "membranous web" pour simplifier) (Berger et al., 2009). La seconde étude, utilisant des cellules Huh7-Lunet transfectées avec un plasmide codant pour les protéines virales NS3 à NS5B, a montré quant à elle que cette diminution d'expression de la PI4K-III $\alpha$  entraînait une formation de nombreuses DMV, plus petites et plus homogènes en taille (Reiss et al., 2011). Deux études similaires, réalisées avec la même souche virale (JFH1), montrent ainsi des résultats différents concernant l'impact de l'activité d'une même protéine sur la modification de la structure des membranes cellulaires. Un autre argument en faveur de réarrangements excessifs dans les cellules surexprimant les protéines virales est la difficulté

d'observation d'un "membranous web" identique à sa description initiale dans les cellules infectées avec JFH1.

Finalement, il faut garder à l'esprit que si la surexpression de protéines virales n'est pas une solution physiologique, l'emploi d'un réplicon sous-génomique sous pression de sélection ou d'un virus complet possédant un taux de réplication hors norme (i.e. JFH1) ne sont pas non plus des alternatives très satisfaisantes. La recherche et la quantification des modifications ultrastructurales présentes chez les patients permettront de confirmer ou d'infirmer l'existence des modifications observées *in vitro*. Ainsi, la présence d'un nombre accru de vésicules autophagiques a été récemment observé *in vivo*, confirmant l'induction de l'autophagie démontrée *in vitro* (Rautou et al., 2011).



**Figure 35.** Altérations ultrastructurales induites par HCV.

(A) et (D) Observation en microscopie électronique à transmission (MET) de cellules d'ostéosarcome U-2 OS exprimant la polyprotéine virale du HCV (génotype 1b, souche Con1), présentant des altérations des membranes cellulaires (Egger et al., 2002). (B) Détail d'une cellule Huh7 répliquant le génome complet JFH1 (génotype 2a) (Rouillé et al., 2006). (C) Détail d'une cellule Huh7 exprimant un réplicon sous-génomique Con1 (génotype 1b) (Gosert et al., 2003). (E) Détail d'une cellule Huh7.5 exprimant un réplicon sous-génomique JFH1 (génotype 2a) et présentant des vésicules à double membrane (Ferraris et al., 2010). (F) Détail d'une cellule Huh7-Lunet transfectée avec une construction permettant l'expression des protéines NS3 à NS5B (Reiss et al., 2011). MW (rouge) = "membranous web" ; CV (vert) = vésicules contigües (pouvant être des DMV) ; DMV = vésicules à double membrane ; LD (violet) = regroupement de gouttelettes lipidiques.

## 5.2.2 Etude de la morphogenèse virale

### 5.2.2.1 Modèles cellulaires

L'étude de la morphogenèse virale *in vitro* repose jusqu'à présent sur l'utilisation de modèles cellulaires dérivés de la lignée d'hépatocarcinome Huh7 (Huh7.5, Huh7.5.1 ou Huh7-Lunet), infectés par la souche virale JFH1 ou ses chimères J6/JFH1 et Con1/JFH1. Il est important de noter que certaines interactions au cours de l'assemblage et de la sécrétion des particules pourraient varier en fonction de la souche virale utilisée, expliquant notamment la plus grande efficacité de sécrétion de la chimère J6/JFH1 comparativement à la souche JFH1 d'origine (Pietschmann et al., 2006). Certains modèles cellulaires alternatifs ont été utilisés, tels que les cellules HepG2 et Caco-2 pour étudier l'association entre apoB et les glycoprotéines d'enveloppe dans un contexte de surexpression de ces dernières (Icard et al., 2009), ou des cellules de rein de hamster BHK-21 pour étudier la formation de la nucléocapside dans un contexte de surexpression à l'aide d'un réplicon SFV (Blanchard et al., 2003) (cf. §4.4.1).

### 5.2.2.2 Compréhension de la morphogenèse virale

Comme nous l'avons vu précédemment dans la partie 4 (cf. §4.4.5), la morphogenèse du HCV semble fortement dépendante de l'assemblage et la sécrétion des lipoprotéines. Une association étroite entre les virions et apoE a pu être observée à plusieurs reprises, alors que l'association avec apoB est plus controversée. Néanmoins, ces deux apolipoprotéines semblent être des facteurs clefs indispensables à la production de particules virales infectieuses.

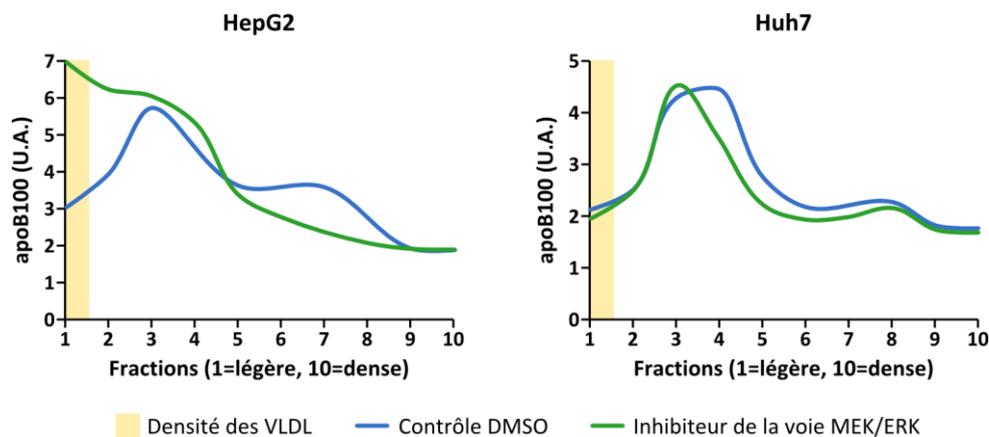
### 5.2.2.3 Limites des systèmes actuels

Seules quelques rares études de l'assemblage du HCV présentent une validation partielle des résultats, obtenus en cellules Huh7 ou dérivées, en réalisant des marquages histochimiques sur coupes de foie (Reiss et al., 2011) ou en analysant la sécrétion en hépatocytes primaires humains (PHH) (Nahmias et al., 2008; Herker et al., 2010). Ce constat est imputable à l'absence de production virale robuste dans d'autres systèmes cellulaires que les cellules Huh7 et dérivées, permettant l'analyse virologique de l'assemblage et de la sécrétion de particules virales infectieuses. La réplication du HCV en PHH à des niveaux permettant des analyses virologiques approfondies (utilisant western blot, immunofluorescence, immunoprecipitation, etc.) n'est obtenue que très difficilement, et jusqu'alors, une seule étude de la sorte a été publiée (Podevin et al., 2010).

La principale limite des résultats obtenus jusqu'à présent provient du constat suivant : les cellules Huh7 et dérivées seraient partiellement déficientes pour la production de VLDL. En effet, la surexpression des glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 en cellules Huh7.5 ne permet pas la sécrétion de particules hybrides contenant à la fois apoB et E2, contrairement à ce qui peut être observé en cellules intestinales Caco-2 ou en cellules d'hépatoblastome HepG2 (Icard et al., 2009). De plus, il a été montré récemment que les cellules Huh7 sécrètent naturellement apoB à une densité supérieure à 1,02 g/mL correspondant à la densité des IDL voire des LDL (Figure 36) (Meex et al., 2011). Or, la sécrétion physiologique d'apoB par des hépatocytes est le reflet de leur sécrétion lipoprotéique, c'est-à-dire la sécrétion de VLDL possédant une densité inférieure à 1,006 g/mL. Toutes les études de la morphogenèse virale ont donc été pour l'instant réalisées dans un modèle peu physiologique s'agissant de la biogenèse des VLDL, alors même qu'une association étroite entre HCV et lipoprotéines semble exister *in vivo*. Il est donc indispensable de développer des modèles cellulaires de production virale dans des cellules plus physiologiques telles que les PHH. Les cellules HepG2 représentent également une alternative intéressante, puisqu'elles sont permissives à l'entrée virale

et à une réplication transitoire après surexpression du récepteur viral CD81 (Bartosch et al., 2003; Mee et al., 2010). De plus, elles semblent capables de sécréter des VLDL en réponse à une stimulation lipidique (acide oléique) et à l'inhibition d'une voie de signalisation suractivée dans ces cellules tumorales (voie MEK/ERK) (Figure 36) (Tsai et al., 2007; Meex et al., 2011).

En plus d'un défaut partiel de sécrétion de VLDL, les cellules Huh7 pourraient également posséder des caractéristiques spécifiques induisant une morphogénèse virale différente de celle qui s'opère chez les patients. La vérification des résultats obtenus dans d'autres modèles (ou directement *in vivo*) semble donc indispensable. Néanmoins, de nombreux résultats obtenus en cellules Huh7, notamment concernant la réplication et l'entrée virale, ont pu être confirmés *in vivo* et ces cellules demeurent le modèle de choix pour comprendre les processus cellulaires impliqués dans le cycle viral du HCV.



**Figure 36.** Sécrétion de VLDL par deux lignées d'hépatome HepG2 et Huh7.

La quantité d'apoB100 dans le surnageant de culture de cellules HepG2 ou Huh7 a été quantifiée par marquage radioactif suivi d'une immuno-capture avec des anticorps anti-apoB. Les cellules ont été incubées au préalable avec du DMSO seul (contrôle) ou avec un inhibiteur de la voie MEK/ERK (composé PD98059). Seules les cellules HepG2 traitées sécrètent la majorité de leur apoB dans les fractions de très faible densité (VLDL). U.A. = unité arbitraire. (Adapté de Meex et al., 2011).

## CHAPITRE II : Objectifs des travaux de recherche

Les travaux de recherche que j'ai entrepris au cours de ma thèse reposent sur le constat suivant : le virus de l'hépatite C (HCV) est associé *in vivo* aux lipoprotéines de l'hôte. On observe notamment une forte hétérogénéité de la densité des particules virales sériques, accompagnée d'une association de l'ARN viral avec les lipoprotéines de faible et de très faible densité (LDL et VLDL) (Thomssen et al., 1992, 1993), formant des particules baptisées lipo-viro-particules (LVP) (André et al., 2002).

Depuis 2005, l'utilisation de la souche virale JFH1, capable d'établir un cycle d'infection productif et de se propager en cellules Huh7 et dérivées (Lindenbach et al., 2005; Wakita et al., 2005; Zhong et al., 2005), a permis de nombreuses découvertes concernant la réplication et la production du HCV. En particulier, la structure et la composition des particules virales sécrétées ont pu être déterminées (Gastaminza et al., 2010; Merz et al., 2011). Ainsi, les virions HCV produits *in vitro* (HCVcc) présentent une forte association à l'apolipoprotéine E (apoE), nécessaire à la production de particules virales et à leur infectiosité (Chang et al., 2007; Benga et al., 2010; Cun et al., 2010), mais pas (ou peu) d'association avec apoB (Jiang and Luo, 2009), contrairement à ce qui a été observé *in vivo*. Comme nous l'avons vu précédemment, ces différences pourraient venir de l'utilisation de lignées cellulaires transformées, qui présentent une sécrétion lipoprotéique altérée. Il semble donc nécessaire de développer de nouveaux modèles cellulaires de réplication du HCV afin de pouvoir étudier l'assemblage, la sécrétion et la composition des particules virales.

Tout d'abord, le développement d'un modèle cellulaire pertinent passe par la caractérisation de la sécrétion lipoprotéique des lignées cellulaires d'intérêt, permettant l'identification d'une lignée capable de produire des VLDL et permissive à la réplication virale. En effet, la sécrétion de LVP est subordonnée à une production physiologique de lipoprotéines. C'est pourquoi nous avons étudié la sécrétion de VLDL dans différentes lignées d'hépatocytes (Huh7.5, HepG2 et HepaRG), en comparaison avec des hépatocytes primaires humains. Cette étude nous a permis de montrer, non seulement que les cellules HepG2, contrairement aux cellules Huh7.5, sont capables de produire des VLDL, mais aussi que la lignée non transformée HepaRG pourrait constituer un nouveau modèle d'étude pertinent de la synthèse des VLDL. Malheureusement, les cellules HepaRG ne semblent pas permissives à l'infection HCV du fait d'une forte réponse cellulaire à l'infection (David Durantel, données non publiées), et ne peuvent donc pas être utilisées dans ce contexte.

Quant aux cellules HepG2, elles pourraient représenter un modèle d'étude plus pertinent que les cellules Huh7.5, mais sont incapables de répliquer HCV de manière persistante, ne permettant pas la sécrétion de virions et l'étude de leur association aux VLDL. Nous avons donc construit un virus JFH1 contenant un gène de résistance à la blasticidine afin de pouvoir répliquer HCV de manière persistante dans ces cellules. Nous avons ainsi pu produire des particules virales dans des cellules compétentes pour la synthèse de VLDL et analyser leur association aux lipoprotéines. L'établissement de ce nouveau système cellulaire a également permis d'étudier l'impact de la réplication virale sur la cellule hôte, notamment en ce qui concerne les modifications viro-induites de l'ultrastructure subcellulaire.

Ces deux travaux ont fait l'objet de deux articles, en cours de publication, qui vont être présentés ci-après.



## **CHAPITRE III : Impact de la différenciation des hépatocytes humains sur l'assemblage et la sécrétion des lipoprotéines de très faible densité.**

### **1 Introduction**

Les lipoprotéines jouent un rôle essentiel dans le métabolisme et l'homéostasie des lipides, permettant le transport des lipides neutres dans l'organisme. La dérégulation du métabolisme lipoprotéique est impliquée dans des pathologies telles que l'infarctus du myocarde et l'athérosclérose (Tomkin and Owens, 2001). Il est donc crucial de mieux comprendre les déterminants moléculaires impliqués dans la production et la sécrétion des lipoprotéines par les hépatocytes.

Jusqu'alors, l'étude de la biogenèse des VLDL reposait majoritairement sur l'utilisation de lignées cellulaires transformées telles que les cellules d'hépatome de rat McA-RH7777 ou les cellules d'hépatome humain HepG2 (Blasiolo et al., 2007). Il est néanmoins important de garder à l'esprit que la faible différenciation de ces cellules cancéreuses et que leur métabolisme gluco-lipidique altéré sont probablement peu physiologiques. En effet, ces cellules présenteraient une modification de la balance énergétique gluco-lipidique, diminuant la phosphorylation oxydative mitochondriale au profit de la glycolyse (effet Warburg) (Guguen-Guillouzo and Guillouzo, 2010; Maier et al., 2010).

C'est pourquoi il est important d'identifier d'autres types cellulaires non transformés et capables de différenciation, permettant de produire des lipoprotéines physiologiques. Ainsi, les cellules HepaRG, des cellules progénitrices bipotentes du foie, pourraient constituer un modèle intéressant pour l'étude de la biogenèse des VLDL. Dans le but d'améliorer la sécrétion lipoprotéique des cellules d'hépatome Huh7.5 et HepG2, nous avons également étudié l'impact de leur redifférenciation partielle. En effet, la plupart des études utilisant ces cellules d'hépatome sont réalisées en phase proliférative, phase durant laquelle la polarisation et l'expression de gènes hépato-spécifiques sont sous-optimales. La caractérisation de conditions de culture permettant une meilleure production lipoprotéique dans ces cellules permettrait une meilleure compréhension de l'assemblage et la sécrétion des VLDL, mais également une meilleure compréhension de l'association du HCV avec ces lipoprotéines.

Nous avons donc étudié la sécrétion de VLDL dans trois lignées cellulaires différentes : Huh7.5, HepG2 et HepaRG. La sécrétion d'apoB et d'apoE a été analysée en condition proliférative ou différenciée, et comparée à celle d'hépatocytes primaires humains (PHH) en culture.

### **2 Approche expérimentale**

*In vivo*, les VLDL sont caractérisées par une densité inférieure à 1,006 g/mL et la présence d'une molécule unique d'apolipoprotéine B 100 (apoB100), de plusieurs molécules d'apoE et d'autres apolipoprotéines échangeables (Blasiolo et al., 2007). Nous avons donc adopté plusieurs approches expérimentales nous permettant de caractériser la sécrétion lipoprotéique. Les cellules ont été incubées 24h dans un milieu de culture sans sérum, puis la présence de VLDL dans le surnageant a été déterminée en analysant la densité des particules positives pour apoB et/ou apoE, la co-sédimentation des deux apolipoprotéines en gradient de densité, et leur co-immunoprécipitation, attestant de l'existence de particules hybrides de très faible densité, c'est-à-dire des VLDL.

**Title:**

**Effect of human hepatocyte differentiation on the assembly and secretion of very low density lipoproteins**

**Running head:** Comparative analysis of VLDL secretion *in vitro*

**Authors and affiliations:**

Baptiste Jammart,<sup>1</sup> Maud Michelet,<sup>1</sup> Nadia Bendridi,<sup>1</sup> Michel Rivoire,<sup>2</sup> Fabien Zoulim,<sup>1,3</sup> and David Durantel<sup>1,§</sup>

<sup>1</sup>Inserm, U1052, Cancer research center of Lyon (CRCL), University of Lyon, Lyon, France

<sup>2</sup>Centre Léon Bérard (CLB), INSERM, U1032, University of Lyon, Lyon, France

<sup>3</sup>Hospices civils de Lyon (HCL), Lyon, France

**Corresponding author:**

David Durantel, PhD

INSERM Unit 1052, CRCL, Team 15: Physiopathology of viral hepatitis

151 cours Albert Thomas, Lyon, Fr-69003

Tel: (+33) 472681992/Fax: (+33) 472681971/E-mail: david.durantel@inserm.fr

**Abbreviations:**

apoB100, apolipoprotein-B100; apoE, apolipoprotein-E; MEK/ERK, mitogen activated protein kinase/extracellular signal regulated kinase; OA, oleic acid; MTP, microsomal triglyceride transfer protein; PHH, primary human hepatocyte; IDL, intermediate density lipoprotein

## **Abstract:**

The *in vitro* study of human VLDL secretion is commonly performed in the human hepatoma cell line HepG2. As many cancer cell lines, HepG2 presents dysregulations of gluco-lipidic metabolism, hampering its relevance to study VLDL assembly and secretion. In this study we characterized VLDL production in two hepatoma cell lines, HepG2 and Huh7, in comparison to primary human hepatocytes (PHH), as well as in a non-transformed cell line, HepaRG. When stimulated with oleic acid and treated with a MEK/ERK inhibitor, proliferative HepG2 (but not Huh7) cells showed co-sedimentation of apoB100 and apoE at very low densities. Furthermore, the production of apoB100/apoE hybrid lipoproteins was impaired in both cell types as no co-immunoprecipitation could be detected. However, partial cell re-differentiation of HepG2 and Huh7 cells using DMSO restored apoB100/apoE co-immunoprecipitation and hybrid lipoprotein production, highlighting the necessity to work with differentiated hepatocytes when studying VLDL assembly and secretion. Differentiated HepaRG cells, as primary human hepatocytes, produced very low density apoB100 and apoE, with co-immunoprecipitation between both apolipoproteins arguing for mature VLDL secretion. We showed here that hepatocyte differentiation improves VLDL production and identified another cell line, HepaRG, of interest to unravel VLDL biogenesis processes *in vitro*.

### **Supplementary key words:**

Lipoprotein; Apolipoprotein B100; Apolipoprotein E; Primary human hepatocytes; Hepatoma cell line, Huh7; Hepatoma cell line, HepG2; Hepatic progenitor cell line, HepaRG; Hepatitis B virus; Hepatitis C virus

## Main text:

### Introduction

Lipoproteins are essential factors of lipid metabolism and homeostasis in eukaryotes, carrying out neutral lipid transport in the organism. In humans, very-low-density lipoproteins (VLDL) are secreted in the bloodstream by hepatocytes and progressively degraded by lipoprotein lipases (LPL) into intermediate- and low-density lipoproteins (IDL and LDL). LPL hydrolyses triglycerides in lipoproteins into free fatty acids and monoacylglycerol molecules, taken up by the tissues for lipid metabolism or storage (1, 2). Genetically or metabolically-induced dysregulation of lipoprotein homeostasis is highly involved in both acute myocardial infarction and atherosclerosis (3). From a human health perspective, it is therefore of primary importance to understand the molecular determinants of lipoprotein production and secretion by human hepatocytes as well as their regulation.

VLDL are mainly composed of lipids (90 wt %) with a neutral lipid core (triacylglycerol and cholesteryl ester) surrounded by a phospholipid and cholesterol monolayer. VLDL-associated proteins are mostly found at the surface of the particle and consist of one molecule of apolipoprotein-B100 (apoB100), shaping the particle, several molecules of apolipoprotein-E (apoE), as well as other apolipoproteins and cellular proteins (1, 2, 4). Several cell culture models have been used to study VLDL biogenesis *in vitro*. Rat hepatoma McA-RH7777 cells secrete much of their apoB100 as buoyant VLDL (5) and contributed widely to the understanding of lipoprotein assembly. However, there are significant differences in terms of lipoprotein metabolism between rat and human (5, 6) and it would therefore be preferable to work with human hepatocyte models. Amongst cells of human origin, many groups have used the HepG2 hepatoblastoma cell line to investigate apoB100 and VLDL assembly and secretion (7–11). It has been recently described that another hepatoma cell line, Huh7, was similar to HepG2 in terms of apoB100-positive lipoprotein synthesis, degradation and secretion in response to oleic acid (OA) stimulation, microsomal triglyceride transfer protein (MTP) or proteasome inhibition (12). However, HepG2 cells have to be treated with specific drugs to improve their VLDL secretion by decreasing density (13), whereas Huh7 cells remain deficient for proper VLDL assembly (12). Altogether cancer-derived hepatocytes should be used with caution as they are not fully differentiated. In particular, cancer-derived cells have an altered gluco-lipidic metabolism and a modified balance between glycolysis and mitochondrial oxidative phosphorylation regarding energy production (i.e. also referred as Warburg effect) (14).

*Ex-vivo* cultivated primary human hepatocytes remain the gold standard *in vitro* model to study VLDL biogenesis despite their scarcity, batch to batch variability, and the fact that dedifferentiation occurs when they are cultivated *ex vivo*. Alternative models are yet to be validated regarding their ability to produce physiologic VLDL, including differentiated induced pluripotent stem cells (iPS) and differentiated HepaRG cells. HepaRG cells are human liver bipotent progenitors, which can differentiate *in vitro* into hepatocytes-like and cholangiocyte-like cells (15), and can be infected by the hepatitis B virus, a hepatotropic virus which replicates only in differentiated hepatocytes (16). This cell line could represent a physiologically relevant model to study VLDL biogenesis.

The aim of this study was thus to compare VLDL secretion in several human cell types including previously used hepatoma cell lines (HepG2 and Huh7.5), HepaRG cells as well as primary human hepatocytes (PHH), which were used as reference model. To this end, we looked at the

secretion of apoB100/apoE-positive lipoproteins by density analysis, co-sedimentation and co-immunoprecipitation. We show that neither proliferative HepG2 cells nor Huh7.5 cells produce physiologic apoB100/apoE-positive lipoproteins, whereas partial cellular re-differentiation, together with treatment with oleic acid (OA) and MEK/ERK inhibitor U0126 rescued the production of hybrid lipoproteins. Regarding the density of apoB100/apoE-positive lipoproteins, HepG2 cells look superior to Huh7.5 as the latter produce mainly intermediate density lipoproteins (IDL), suggesting a defect in lipidation. Finally, differentiated HepaRG cells secrete quasi-physiologic VLDL as compared to PHH and represent therefore a new interesting model to study the molecular determinants of VLDL assembly and secretion.

## **Material & Methods**

### ***Cell Culture***

Huh7.5 cells were a kind gift from Dr. Charles M. Rice (The Rockefeller University, NY, USA) (17). HepG2 cells stably transduced with a lentiviral vector expressing CD81 were a kind gift from Dr. Birke Bartosch (INSERM, U1052, Lyon, France) (18, 19). HepaRG were previously described (15, 16, 20). Primary human hepatocytes (PHH) were freshly prepared from surgical liver resections as previously described (21). Cell culture medium and reagents were purchased from Life Technologies (Paisley, UK), unless otherwise specified. Fetal bovine serum HyClone FetalClone II (FCII; Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), was used for all cultures. Huh7.5 and HepG2 cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle medium (High glucose DMEM) containing 10% FCII, 1x GlutaMAX, 1mM sodium pyruvate, 100 units/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin in 5% CO<sub>2</sub>-normoxia incubator at 37°C. HepG2 cells were cultured on collagen coated surfaces (Type I collagen from rat tail; Sigma, Saint-Louis, MO, USA). HepaRG cells were maintained in William's medium E containing 10% FCII, 5 µg/mL human insulin (Sigma, Saint-Louis, MO, USA), 500 nM hydrocortisone hemisuccinate (Laboratories SERB, Paris, France), 1x GlutaMAX, 100 units/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin in 5% CO<sub>2</sub>-normoxia incubator at 37°C. HepaRG cells were differentiated as previously reported (15). Briefly, culture medium was changed twice a week for 4 weeks. After 2 weeks of culture, 1.8 % dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma, Saint-Louis, MO, USA) was added to the medium for 2 more weeks. Culture medium was (or not) supplemented with 10 ng/mL epidermal growth factor (EGF; PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA) from the start of the differentiation protocol. PHH were kept in William's medium E supplemented with 5 µg/mL human insulin, 500 nM hydrocortisone hemisuccinate, 1x GlutaMAX, 100 units/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin, 2 % FCII, and 2 % DMSO; the latter being important to maintain their differentiated phenotype.

### ***Antibodies & reagents***

Chemicals were purchased from Sigma (Saint-Louis, MO, USA), unless otherwise specified. Tris(hydroxymethyl)aminomethane, sucrose and bovine serum albumin fraction V (BSA) were purchased from Euromedex (Mundolsheim, France). Complete protease inhibitor cocktail was purchased from Roche (Indianapolis, IN, USA). Protein G-coated magnetic beads (BioAdembeads) were obtained from Ademtech (Pessac, France). IgG from goat serum was obtained from Sigma. Goat polyclonal anti-apoB (#ab27626) and anti-apoE (#ab7620) antibodies and mouse monoclonal anti-apoE antibody [E6D7] (#ab1907) were purchased from Abcam (Cambridge, UK). Goat polyclonal anti-apoB (#AF3556) was purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Control VLDL were obtained from the floating phase of ultracentrifuged of human plasmas (EFS, Lyon, France).

### ***Density gradient separation of lipoproteins***

Cells at confluence or differentiated cells were incubated in 5 % CO<sub>2</sub>-normoxia incubator at 37°C for 24h in fresh medium deprived of serum and containing either 10 % (v/v) of BSA-coupled oleic acid (Sigma) (10 mg/mL BSA and 300 µM OA final) and 1 µM U0126 (20 mM stock, diluted in DMSO), or 10 % (v/v) of BSA (10 mg/mL final) as a control. Supernatants were harvested (8 to 10 mL for a culture surface of 60 cm<sup>2</sup>), spun at 11,000 g for 5 min to remove cell debris, 0.45 µm filtered, supplemented with protease inhibitors, and loaded on Amicon Ultracel 100K centrifugal filter units (Millipore, Billerica, MA, USA) to concentrate them according to the manufacturer protocol. Concentrated supernatant (1 mL) were loaded on pre-cast iodixanol-sucrose density gradients (see below for details) and ultracentrifuged for 10h at 55,000 rpm and 4°C using SW 55 Ti rotor in Optima L-90K centrifuge (Beckman, Indianapolis, IN). Fractions of 400 µL were harvested from the top of the tube and their density was determined with a refractometer. Iodixanol-sucrose density gradients were prepared as following. Four 1 mL-fractions ranging from 35 % to 6 % iodixanol were loaded and frozen successively to obtain a frozen discontinuous gradient. Each fraction contained 10 mM Tris HCl pH 8, 2 mM EDTA pH 8, iodixanol (OptiPrep density medium) and sucrose (each fraction was filled up to 1 mL with 0.25 M sucrose to keep osmolarity).

### ***ApoB100 quantification***

ApoB100 was quantified in each fraction or in filtered culture supernatants using a commercial ELISA kit from AlerCHEK (Springvale, ME, USA) and following the manufacturer protocol.

### ***Apolipoprotein immuno-precipitations***

Harvested and filtered supernatants (0.5 to 1 mL, see above) were incubated with 2 µg/mL (proliferative cells) or 4 µg/mL (differentiated cells) of anti-apoB or anti-apoE antibodies (#ab27626 or #ab7620, respectively) or control IgG for 1h30 at room temperature, under agitation (1,000 rpm). Washed, protein G coated magnetic beads (10 µL / µg antibody) were then added and the supernatants were incubated for 1h30 at room temperature, under agitation. Magnetic beads were washed 5 times then resuspended with cold PBS supplemented with protease inhibitors for western blotting.

### ***Western blotting***

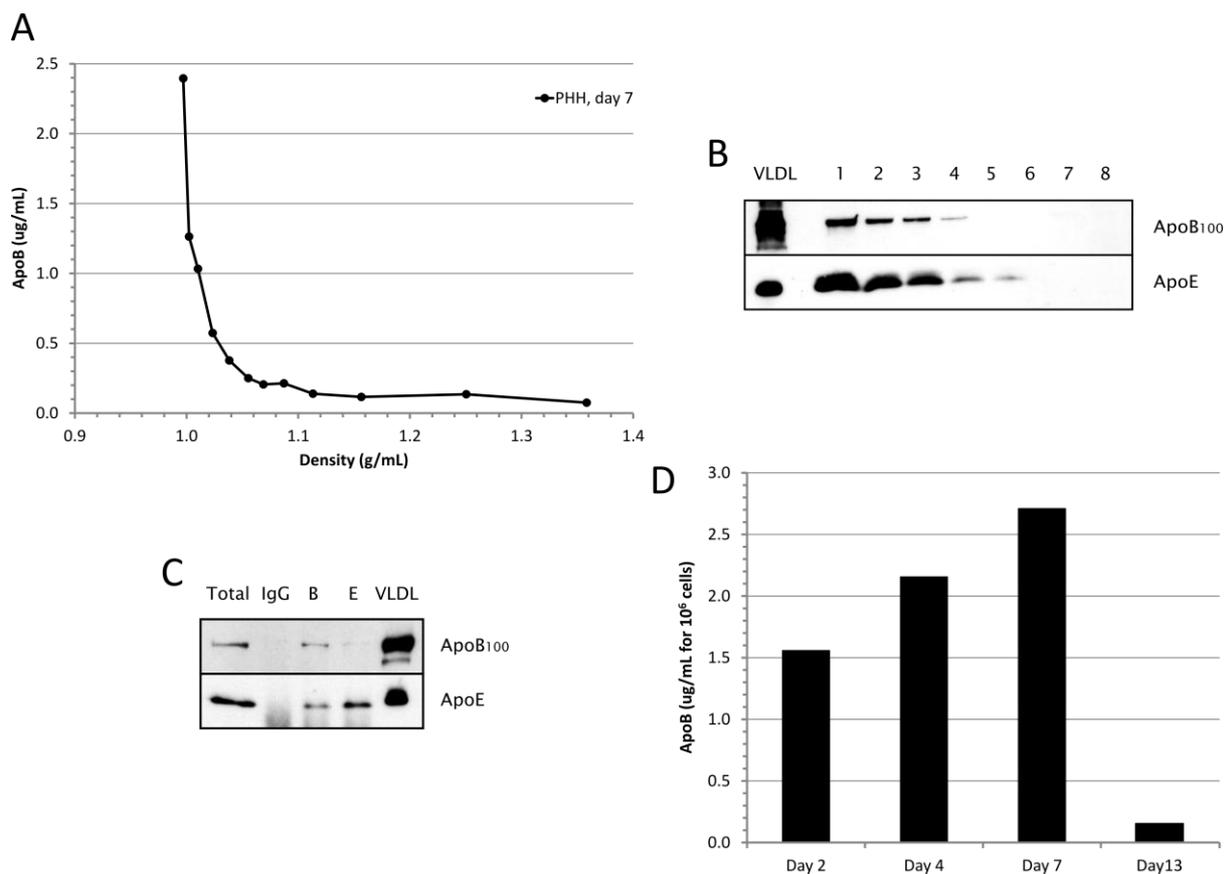
Density gradient fractions or immunoprecipitates were denatured 5 min at 95°C in Laemmli buffer and proteins were separated using SDS-PAGE. After blotting on a nitrocellulose membrane, apoB100 and apoE proteins were revealed using respectively a goat polyclonal anti-apoB antibody (#AF3556) and a mouse monoclonal anti-apoE [E6D7] antibody. Anti-goat and anti-mouse antibodies coupled to horseradish peroxidase were used to detect proteins by enhanced chemiluminescence.

## **Results**

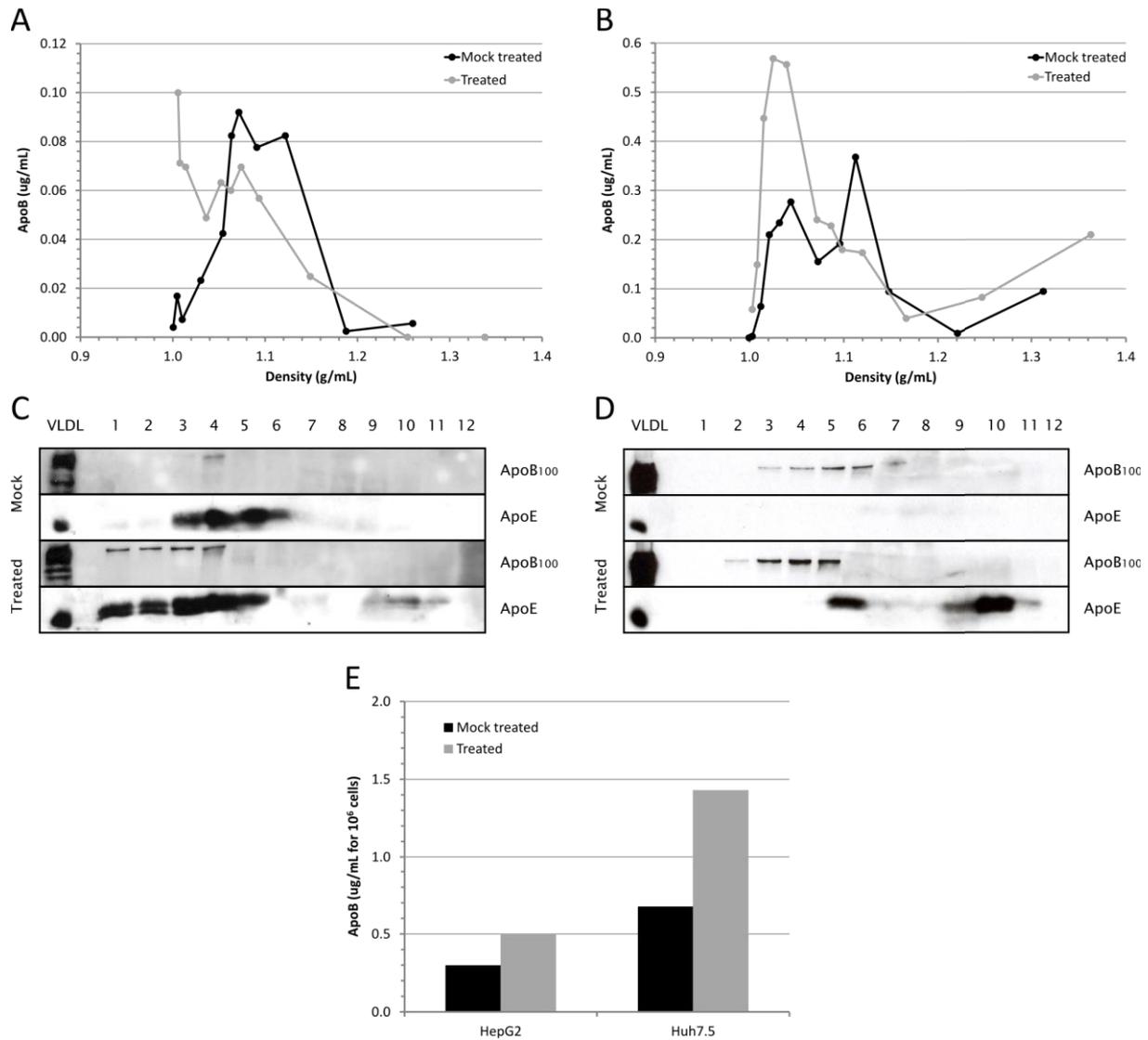
### ***Primary human hepatocytes secrete VLDL***

Freshly isolated primary human hepatocytes represent the “gold standard” model to study the assembly and secretion of VLDL, although it is worth noting that they are confronted to availability (i.e. quantity and frequency of preparations) and batch to batch variation issues. It has been therefore difficult to extensively work on the molecular determinants of VLDL intracellular biogenesis with this model. However, PHH cells can be used to set the reference for comparative

studies of VLDL secretion. We analyzed biochemically the secretion of VLDL by 7-day-old PHH. PHH do secrete physiologic VLDL, as determined by the detection of apoB100 in the very-low density range ( $d < 1.006$  g/mL) (Fig. 1A, B), and the co-segregation, as well co-immunoprecipitation of apoB100 and apoE (Fig. 1B, C). Maximum VLDL production, as determined by apoB100 quantification by ELISA in the culture medium, occurs at day 7 post-isolation of cells with about 2.5  $\mu\text{g/mL}$  (24h production by  $10^6$  cells) (Fig. 1D). As expected, due to dedifferentiation of PHH cultivated *ex vivo* (22), apoB100 secretion was no more detected by day 13 post-seeding, confirming that PHH, in 2D collagen coated plates, must be used early post seeding (Fig. 1D). VLDL production by 7-day-old PHH represents therefore the reference in this study for further comparison with the other cell lines.



**Fig. 1. VLDL secretion in primary human hepatocytes (PHH).** Freshly isolated PHH were maintained in culture up to 13 days. Serum-free medium was added to cells 24h before harvesting. Supernatants were harvested and subjected to apoB100 quantification by ELISA, to immunoprecipitation or to density separation on a iodixanol-sucrose gradient (for day 7 harvest). Immunoprecipitations were performed on supernatants with 4  $\mu\text{g/mL}$  of anti-apoB100 (lane B) or anti-apoE (lane E) antibodies, using protein G-coated magnetic beads. IgG from goat serum were used as negative control. Immunoprecipitated apoB100 or apoE were detected by immunoblotting with specific antibodies. (A) ApoB100 ELISA on each fraction of the density gradient (day 7). (B) ApoB100 and apoE immunoblotting in each fraction (day 7). (C) Immunoprecipitated fractions (day 7). (D) ApoB100 quantification using ELISA on total supernatants of days 2, 4, 7 and 13. Results were normalized according to cell number. VLDL = control VLDL from human serum.



**Fig. 2. Effect of oleic acid stimulation and MEK/ERK inhibition on apolipoprotein secretion by HepG2 and Huh7.5 cells.** Subconfluent HepG2 or Huh7.5 cells were incubated for 24h with medium without serum containing 10 % (v/v) OA-BSA and 1  $\mu$ M U0126 (Treated) or containing 10 % (v/v) BSA (Mock). Supernatants were harvested and subjected to apoB100 quantification by ELISA or to density separation on a iodixanol-sucrose gradient. (A) ApoB100 ELISA on each fraction for HepG2 cells. (B) ApoB100 ELISA on each fraction for Huh7.5 cells. (C) ApoB100 and apoE immunoblotting in each fraction for HepG2 cells. (D) ApoB100 and apoE immunoblotting in each fraction for Huh7.5 cells. (E) ApoB100 quantification using ELISA on total HepG2 and Huh7.5 cell supernatants. Results were normalized according to cell number. VLDL = control VLDL from human serum.

***Proliferative hepatoma cell lines HepG2 and Huh7.5 secrete intermediate and low density apolipoproteins***

Before investigating VLDL production in a recently described cell line, i.e. HepaRG, we sought to revisit some of the data regarding the assembly and secretion of apoB100/apoE positive lipoproteins in hepatoma cells. We first determined the density of apoB100 positive lipoproteins secreted by subconfluent (i.e. end of proliferation stage) HepG2 and Huh7.5 cells, the two most frequently used human hepatoma cell lines to study apoB-positive particles biogenesis *in vitro* (12).

To this end, we harvested culture supernatants after a 24h-incubation in serum-free medium containing 10% BSA (10 mg/mL final) and loaded these supernatants on iodixanol-sucrose density gradients. Each fraction of the resulting density separation was assessed for apoB100 and apoE by western blotting and apoB100 was also quantified using a commercial ELISA assay. With those cells, apoB100 was not found in the VLDL density range ( $d < 1.006$  g/mL), but rather in the IDL (1.006-1.019 g/mL), LDL (1.019-1.063 g/mL) and HDL ( $d > 1.063$  g/mL) ranges (Fig. 2A, B), thus confirming previous results (12).

Confluent Huh7.5 cells secreted more (600 pg/mL/ $10^6$  cells versus 300 pg/mL/ $10^6$  cells; Fig. 2E) and lower density apoB100 (Fig. 2B), compared to HepG2 cells (Fig. 2A). Western blot analysis of apoB100 and apoE in the different fractions showed that full-length apoB100 was hardly detectable in supernatants from HepG2 cells (Fig. 2C, top panel), whereas it corresponded exactly to apoB100 detected by ELISA for Huh7.5 cells (Fig. 2D, top panel). It is worth noting that apoE was hardly detected in Huh7.5 cells (Fig. 2D) and its density distribution was shifted compared to apoB100 (data not shown). In HepG2 cells however, apoE and apoB100 density distribution were similar (Fig. 2C, top panel), suggesting a better basal association between both apolipoproteins in HepG2 cells.

Together, these first results confirmed that both cell types, when studied at a proliferative stage, are deficient for the production of very low density apoB100 and apoE, and thus for the production of physiologic VLDL.

#### ***Oleate stimulation and MEK/ERK inhibition improve very-low-density lipoprotein secretion in HepG2 but not in Huh7.5 cells***

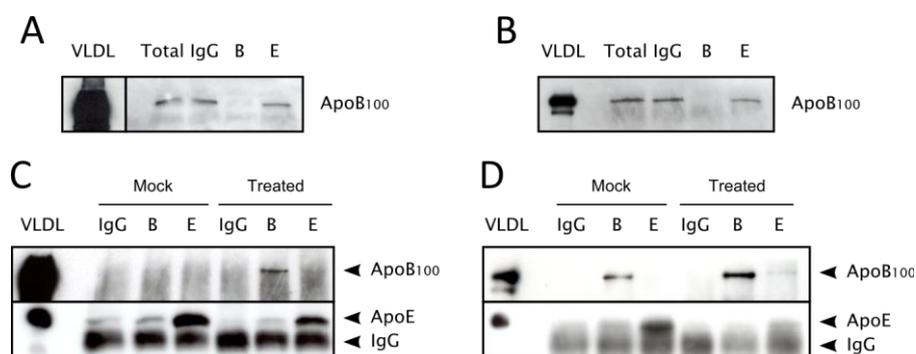
HepG2 and Huh7.5 cell lines are both transformed cell lines, and their metabolism is therefore strongly modified compared to normal hepatocytes. Indeed, it has been recently shown that HepG2 cells have considerable high ERK1/2 mass and activity compared to PHH and that the inhibition of this signaling pathway partially corrects VLDL secretion defect in HepG2 cells (12, 13). Furthermore, lipidic stimulation using for instance oleic acid (OA) has been described to stimulate lipoprotein secretion in HepG2 cells (8, 12, 13). We thus investigated the effects of OA stimulation and MEK/ERK inhibition using the MEK1/2 inhibitor U0126 on the secretion of both apoB100 and apoE apolipoproteins. We noticed that OA/U0126-treated HepG2 cells produced slightly more apoB100 (500pg/mL/ $10^6$  cells versus 300pg/mL/ $10^6$  cells; Fig. 2E) and that the densities of secreted apoB100 and apoE were drastically decreased compared to untreated ones (Fig. 2A, C). Indeed, most of the secreted lipoproteins were found in the very first fractions of the gradient, at a density below 1.006 g/mL, in the VLDL density range (Fig. 2A). In Huh7.5 cells, OA stimulation and MEK/ERK inhibition also induced an increased apoB100 secretion compared to untreated cells (1400 pg/mL/ $10^6$  cells versus 600 pg/mL/ $10^6$  cells; Fig. 2E). However no major density shift was observed in those cells (Fig. 2B, D). Moreover, no co-sedimentation between apoE (ranging from fraction #6 to #11) and apoB100 was observed in Huh7.5 cells, even after drug treatment (Fig. 2D, lower panel).

This data confirm that apoB100 and apoE positive particles within VLDL density range can be secreted by HepG2 cells but not by Huh7.5 cells, pointing out important differences between both cell lines in basal conditions (i.e. cells not partially re-differentiated).

#### ***Proliferative HepG2 and Huh7.5 cells produce no or little hybrid apoB100/apoE positive lipoproteins***

VLDL are characterized by their very low density, by their lipid composition (with mainly triglycerides) but also by their apolipoprotein content. Indeed, VLDL have been described as apoB100, apoE and apoC-positive lipoproteins (2, 4), contrary to IDL and LDL which are apoE negative

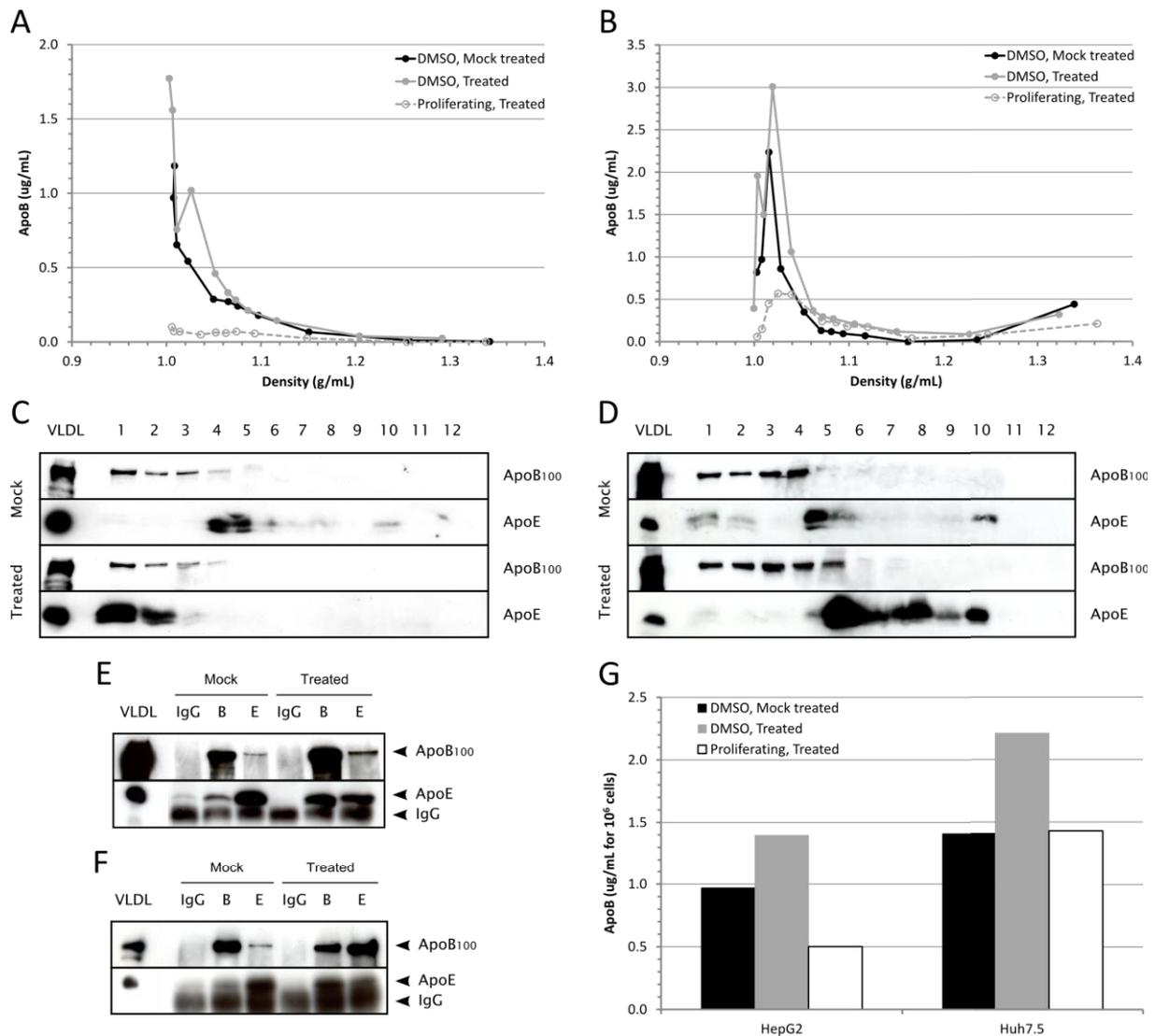
or faintly positive (23). In order to determine whether HepG2 cells and Huh7.5 cells could produce apoB100/apoE positive VLDL, we looked at the presence of both lipoproteins in the same particle by immuno-precipitation assays. Culture media were harvested after 24h incubation in serum-free medium, with or without OA and U0126 MEK/ERK inhibitor, and subjected to immuno-precipitation using anti-apoB100 or anti-apoE antibodies. Despite a total immunoprecipitation of each apolipoprotein in both cell types (Fig. 3A, B, data not shown), we did not observe any significant co-immuno-precipitation of apoB100 and apoE, as shown by immuno-blotting with anti-apoB100 and anti-apoE antibodies after immuno-precipitation (Fig. 3C, D). The vast majority of secreted lipoproteins in subconfluent HepG2 and Huh7.5 cells does not seem to be positive for both apoB100 and apoE, and therefore does not resemble typical VLDL despite their low or very low densities. In conclusion, it seems that neither HepG2 nor Huh7.5 cells could produce physiological VLDL when they are subconfluent.



**Fig. 3. Co-immunoprecipitation of apoB100 and apoE in HepG2 and Huh7.5 cell supernatants.** Subconfluent HepG2 or Huh7.5 cells were incubated for 24h with medium without serum containing 10 % (v/v) OA-BSA and 1  $\mu$ M U0126 (Treated) or containing 10 % (v/v) BSA (Mock). Supernatants were immunoprecipitated with 2  $\mu$ g/mL of anti-apoB100 (lane B) or anti-apoE (lane E) antibodies, using protein G-coated magnetic beads. IgG from goat serum were used as negative control. Immunoprecipitated apoB100 or apoE were detected by immunoblotting with specific antibodies. (A) Total and flow-through fractions for HepG2 cells to assess IP efficiency. (B) Total and flow-through fractions for Huh7.5 cells. (C) Immunoprecipitated fractions for HepG2 cells. (D) Immunoprecipitated fractions for Huh7.5 cells. VLDL = control VLDL from human serum.

### ***Partial cell re-differentiation improves the quality of secreted lipoprotein in hepatoma cells***

VLDL are produced *in vivo* by fully differentiated hepatocytes. However, HepG2 and Huh7.5 cells are transformed cells, which have lost most of their differentiated features. We therefore hypothesized that partial cellular re-differentiation of both cell types could improve their lipoprotein and VLDL secretion. Sainz and Chisari have demonstrated that Huh7 cells could be partially re-differentiated using dimethyl sulfoxide (DMSO), leading to growth arrest and increased expression of albumin, A1AT and HNF-4 mRNA (24). Previous data have also shown that HepG2 cells can acquire a more differentiated phenotype upon DMSO treatment (25). Moreover DMSO has been used to maintain a differentiated status in *ex vivo* cultivated PHH (14), the differentiated status of PHH being associated with permissivity to hepatitis B virus infection (26). We also observed that apoB100 secretion in proliferative Huh7.5 cells increased with cell monolayer density (Suppl. Fig. 1). We thus partially re-differentiated HepG2 and Huh7.5 cells for 4 days after confluence using 2% DMSO. We



**Fig. 4. Effect of partial cell re-differentiation on apolipoprotein secretion by HepG2 and Huh7.5 cells.** Confluent HepG2 or Huh7.5 cells were partially re-differentiated for 3 days with 2 % DMSO and incubated another 24h with medium without serum and containing 2 % (v/v) DMSO, 10 % (v/v) OA-BSA and 1  $\mu$ M U0126 (Treated) or containing 2 % (v/v) DMSO and 10 % (v/v) BSA (Mock). Supernatants were harvested and subjected to apoB100 quantification by ELISA, to immunoprecipitation or to density separation on a iodixanol-sucrose gradient. Subconfluent proliferative and OA/U0126-treated cells were added as a reminder (**Fig. 2**). Immunoprecipitations were performed with 4  $\mu$ g/mL of anti-apoB100 (lane B) or anti-apoE (lane E) antibodies, using protein G-coated magnetic beads. IgG from goat serum were used as negative control. Immunoprecipitated apoB100 or apoE were detected by immunoblotting with specific antibodies. (A) ApoB100 ELISA on each fraction for HepG2 cells. (B) ApoB100 ELISA on each fraction for Huh7.5 cells. (C) ApoB100 and apoE immunoblotting in each fraction for HepG2 cells. (D) ApoB100 and apoE immunoblotting in each fraction for Huh7.5 cells. (E) Immunoprecipitated fractions for HepG2 cells. (F) Immunoprecipitated fractions for Huh7.5 cells. (G) ApoB100 quantification using ELISA on total HepG2 and Huh7.5 cell supernatants. Results were normalized according to cell number. VLDL = control VLDL from human serum.

observed in Huh7.5 cells the acquisition of a more differentiated and polarized phenotype with an increased albumin and HNF-4 mRNA expression and with the apparition of functional canalicular structures (Suppl. Fig. 2), thus confirming previous results (24).

Then, we performed the same experiments as before in partially re-differentiated HepG2 and Huh7.5 cells. First, DMSO treatment itself induced a drastic lowering of the density of secreted apoB100 in HepG2 cells (Fig. 4A, C). However, no significant density shift was observed for DMSO-treated Huh7.5 cells (Fig. 4B, D). Second, OA stimulation and MEK/ERK inhibition potentiated the effect of DMSO in HepG2 cells with a good co-sedimentation of apoB100 and apoE in the very-low-density fractions of the gradient (Fig. 4C), whereas no marked effect was observed in Huh7.5 cells (Fig. 4D). Third, when looking at absolute quantification of apoB100 secretion, we observed in both cell types an increase in the amount of secreted apoB100 after DMSO treatment, potentiated by OA and U0126 stimulation (Fig. 4G). Finally and surprisingly, we observed a faint co-immunoprecipitation between apoB100 and apoE upon DMSO treatment, but a strong co-immunoprecipitation between both apolipoproteins after OA and U0126 stimulation of partially re-differentiated HepG2 and Huh7.5 cells (Fig. 4E, F).

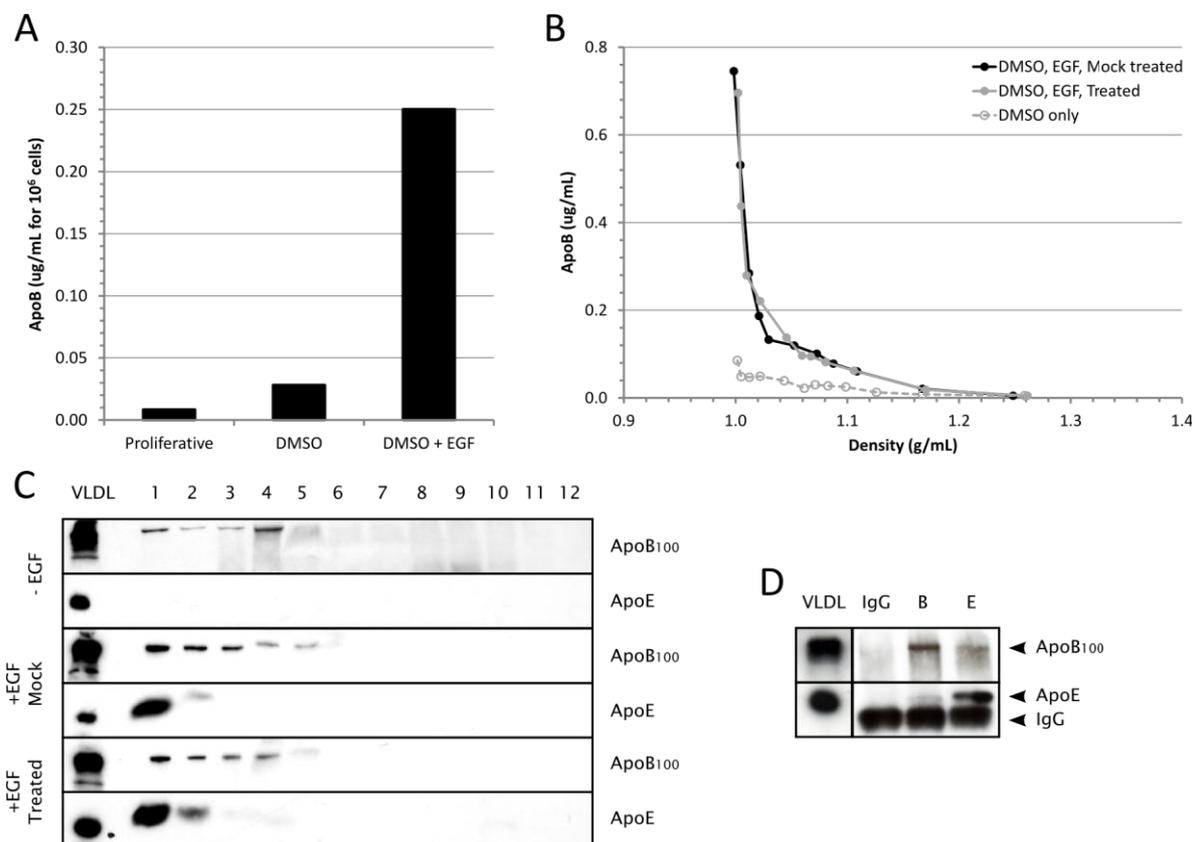
To sum up, we reproduced co-sedimentation and co-immunoprecipitation of apoB100 and apoE in partially re-differentiated HepG2 and Huh7.5 treated with OA and a MEK/ERK inhibitor. A very-low-density secretion of both apolipoproteins was obtained in HepG2 cells, but not in Huh7.5 cells. Therefore, HepG2 cells seem able to produce quasi-physiologic VLDL when treated with DMSO, OA and a MEK/ERK inhibitor. As for Huh7.5 cells, they might also produce VLDL, but with a higher density probably due to lipoprotein lipidation defects.

#### ***Differentiated HepaRG cells, as PHH, produce mature very-low-density lipoproteins***

We have established that HepG2 cells can produce quasi-physiologic VLDL when partially re-differentiated with DMSO and treated with both OA and a MEK/ERK inhibitor. However, these cells are not normal hepatocytes and cannot therefore represent a relevant cell culture model to study many aspects of the regulation of VLDL biogenesis, including for instance the repercussions of gluco-lipidic metabolism alterations on VLDL secretion. Indeed these cancer cells already have an impaired metabolism. By contrast, HepaRG cells are considered as one of the best alternative model to PHH (14). These non-transformed cells are liver bipotent progenitors that can differentiate *in vitro* and in an easy-to-handle 2D configuration into both cholangiocyte-like and hepatocyte-like cell types, after 4 weeks of cultivation without trypsination, including 2 weeks with DMSO treatment. The differentiation of HepaRG cells, and its importance for permissivity to hepatotropic viruses for instance, has been previously described (15, 16, 20). Our objective was to investigate whether these cells could be relevant to study VLDL assembly and secretion.

Beside the importance of DMSO for the differentiation of HepaRG cells *in vitro*, it was also shown that the addition of epidermal growth factor (EGF) in the medium throughout the HepaRG differentiation process committed cells towards the hepatocyte-like lineage (Suppl. Fig. 3); therefore we used EGF to cultivate HepaRG cells in this study to increase and potentiate VLDL production. First, we quantified apoB100 secretion by HepaRG cells, before or after the differentiation process, with or without EGF treatment. Only EGF-treated and differentiated HepaRG cells secreted significant amounts apoB100 (250 pg/mL/10<sup>6</sup> cells), suggesting that mainly hepatocyte-like cells can secrete apoB100 (Fig. 5A). It is worth noting that the daily production of VLDL by HepaRG cells is 10 times lower than that observed with PHH (0.25 versus 2.5 µg/mL/10<sup>6</sup> cells). When looking at apoB100

(Fig. 5B, C) and apoE (Fig. 5C) density repartition, we could find that most of secreted apolipoproteins were in the very low density fractions, suggesting a potent VLDL secretion in differentiated HepaRG cells. This result was confirmed by a fair amount of co-immunoprecipitation between apoB100 and apoE (Fig. 5D).



**Fig. 5. Secretion of VLDL by HepaRG cells.** HepaRG cells were differentiated for 4 weeks in presence or absence of EGF as described in the Material and Methods section. Proliferative HepaRG cells were used as controls. Cells were incubated for 24h with medium without serum but containing 10 % (v/v) OA-BSA and 1  $\mu$ M U0126 (Treated) or containing 10 % (v/v) BSA (Mock). Supernatants were harvested and subjected to apoB100 quantification by ELISA, to immunoprecipitation or to density separation on a iodixanol-sucrose gradient. Immunoprecipitations were performed with 2  $\mu$ g/mL of anti-apoB100 (lane B) or anti-apoE (lane E) antibodies, using protein G-coated magnetic beads. IgG from goat serum were used as negative control. Immunoprecipitated apoB100 or apoE were detected by immunoblotting with specific antibodies. (A) ApoB100 quantification using ELISA on total supernatants of HepaRG cells. Results were normalized according to cell number. (B) ApoB100 ELISA on each fraction of the density gradient for HepaRG cells differentiated in presence or absence of EGF. (C) ApoB100 and apoE immunoblotting in each fraction for HepaRG cells differentiated in presence or absence of EGF. (D) Immunoprecipitated fractions for HepaRG cells differentiated in presence of EGF. VLDL = control VLDL from human serum.

## Discussion

The study of human VLDL biogenesis *in vitro* remains challenging as the most relevant cell culture model relies on freshly isolated primary human hepatocytes (PHH), mainly from surgical liver resection. Besides PHH, the HepG2 cell line has been largely used to investigate some molecular aspects of VLDL biogenesis, and was recently shown to be superior to Huh7 (12), another hepatoma cell line which has become very popular because of its permissivity to hepatitis C virus (HCV) (27). As HCV is strongly associated to lipoproteins *in vivo* (28, 29), a great interest in the molecular characterization of such association has emerged, as well as the need for a relevant cell culture model. However HepG2 and Huh7 (as well as the derived clone 7.5) are both cancerous cells and are thus very different from differentiated hepatocytes (14). In this work we demonstrate that the differentiation status is indeed critical for the secretion of physiologic or quasi physiologic VLDL by hepatoma cells. The HepaRG cell line appeared to be an original and relevant model to study the molecular determinants of VLDL assembly and secretion.

Among the apolipoproteins which characterize VLDL, apoE is of major importance. ApoE is responsible for the interaction of VLDL remnants with the LDL receptor (LDLR), thus mediating VLDL clearance from the blood stream (1). An increased hepatic expression of apoE has also been shown to promote VLDL secretion in *in vivo* and *in vitro* mice models (1, 30). Finally, apoE is found on luminal VLDL during morphogenesis and participates in VLDL production (30–32). It is therefore of prime importance to look at the presence of apoE in addition to apoB100 on secreted lipoproteins *in vitro* to establish the pertinence of the cellular models which are used. We have confirmed here that PHH are able to secrete very low density apoB100/apoE positive lipoproteins, arguing for a physiological VLDL secretion in freshly isolated human hepatocytes. Unfortunately the use of PHH is restricted by their availability as well as by problems linked to genetic and/or environmental polymorphism of donors. Moreover if cultivated in standard conditions (i.e. in 2D, on collagen-coated surfaces), PHH dedifferentiate rapidly and lose their ability to produce physiologic VLDL as shown in this study (Fig. 1). Only complex and expansive culture conditions (e.g. hepatocytes embedded between a collagen substratum and a matrigel 3D overlay) may preserve to some extent their differentiated phenotype and be therefore of potential use to maintain VLDL secretion (22).

The use of human immortalized and/or transformed cell culture models remains more affordable and convenient to study VLDL assembly and secretion. However, it has been recently shown that Ras/MEK/ERK signaling pathway is frequently over-activated in hepatocarcinomas and could be implied in the development and maintenance of hepatocellular cancers (33, 34). Therefore it is not surprising to note that hepatoma cell lines Huh7.5 and HepG2 have an over-activated MEK/ERK pathway contributing to their proliferation potential (13). We confirmed the findings recently reported by Meex and colleagues (12), that: both cell lines do not produce proper VLDL in standard culture conditions; treatment with both oleic acid (OA) and MEK/ERK inhibitors increases the amount of secreted apoB100 in both cell types, while decreasing apoB100- and apoE-positive lipoprotein densities towards very low densities. This argues for a superiority of HepG2 cells over Huh7.5 cells concerning VLDL secretion.

The results of our study have provided new information regarding the role of differentiation on VLDL production. As seen with PHH, physiologic apoB100 and apoE secretions seem to be highly dependent on the differentiation and polarization status of the cells. When cultured in standard conditions, HepG2 and Huh7.5 cells show a poorly differentiated phenotype and do not secrete (or

only very few) very low density apoB100/apoE positive particles. Nevertheless, the more these cells are confluent, establish intercellular junctions, decrease proliferation and acquire polarization, the more they secrete apoB100/apoE positive particles in the VLDL density range. Indeed, after a 4-day DMSO treatment post-confluence, both HepG2 and Huh7.5 cell lines are able to produce mainly apoB100 and apoE hybrid particles when stimulated with oleic acid and treated with a MEK/ERK inhibitor (Fig. 4). Surprisingly we could not achieve 100 % co-immunoprecipitation between both apolipoproteins in any cell type, including PHH. This could be easily explained by the exchangeable nature of apoE. Indeed, this apolipoprotein has a low affinity to lipoprotein due to its N-terminal four-helix bundle that can adopt either open or closed conformations, depending upon the surface concentration of emulsion-bound apoE (35). The exchangeable nature of apoE can be seen in our experiments by the high and variable background immunoprecipitation observed using goat IgG as a negative control (Fig. 3, 4).

In this study we demonstrated that both HepG2 and Huh7.5 cell types are able to secrete apoB100 and apoE hybrid lipoproteins when they are partially re-differentiated with DMSO, stimulated with OA and corrected in their over-activated MEK/ERK phenotype. The difference between both cell types resides in lipoprotein secretion density. Indeed, HepG2 cells are able to secrete very-low-density lipoproteins whereas Huh7.5 cells only secrete intermediate- to low-density apoB100/apoE lipoproteins. Huh7.5 cells may have a defect in lipoprotein lipidation and thus produce IDL instead of VLDL. HepG2 cells are therefore superior to Huh7 (and derived) cells to study hepatic lipoprotein assembly and secretion.

However, it would be interesting to develop other models than those relying on HepG2 or Huh7 cells. HepaRG cells have been largely characterized by many groups regarding their close hepatic phenotype and physiology, and are now recognized as one of the best alternative model to PHH (14). The production of lipoproteins by these cells had not been characterized. In this study, we demonstrate that differentiated HepaRG, in particular HepaRG committed to hepatocyte-like cells by EGF treatment, are capable to secrete physiologic VLDL (Fig. 5). The basal VLDL production level of HepaRG cells is 10 times lower than that observed by PHH, but it does not depend on the addition of OA or MEK/ERK inhibitors to be in the VLDL density range, with co-segregation and co-immunoprecipitation of apoB100 and apoE. The lower VLDL production levels of HepaRG cells may be due to an incomplete differentiation process or to yet non-adapted conditions of culture (i.e. presence of insulin, high amount of glucose...). Further investigations are needed to better characterize the conditions of VLDL production by HepaRG cells. However, as compared to HepG2 and Huh7 cells, they are indubitably best suited to study yet unsolved issues regarding the molecular determinants of VLDL biogenesis. Moreover, in contrast to PHH, HepaRG can be easily engineered/genetically manipulated using various viral vectors to generate recombinant cell lines for mechanistic studies.

Finally, our results showed that hepatic cell differentiation status plays a crucial role in VLDL biogenesis and could improve apolipoprotein secretion by commonly used hepatoma cell lines HepG2 and Huh7. We also described here a novel hepatic cell line, HepaRG, which is capable, as PHH, to secrete mature VLDL after differentiation and could be therefore of high interest to study VLDL biogenesis and its regulation *in vitro*.

## **Acknowledgments:**

We would like to thank Dr Birke Bartosch and Romain Parent for their critical reading of the manuscript. We also thank Dr Souphalone Luangsay for providing RTqPCR experimental conditions to study hepato-specific gene expression. At last, we would like to thank the staff of Pr Rivoire's Surgical Unit in charge of the preparation of the liver resection used for PHH isolation. This work was supported by a grant from the French National Agency for Research against AIDS and viral hepatitis (ANRS; AO1-2008-CSS4) and by the INSERM core grant. BJ was recipient of a bursary from the French Ministry of Research and Higher Education and also from the "Association pour la Recherche sur le Cancer" (ARC).

## References:

1. Blasiolo, D. A., R. A. Davis, and A. D. Attie. 2007. The physiological and molecular regulation of lipoprotein assembly and secretion. *Mol Biosyst* **3**: 608-19.
2. Schittmayer, M., and R. Birner-Gruenberger. 2009. Functional proteomics in lipid research: lipases, lipid droplets and lipoproteins. *J Proteomics* **72**: 1006-1018.
3. Tomkin, G. H., and D. Owens. 2001. Abnormalities in apo B-containing lipoproteins in diabetes and atherosclerosis. *Diabetes Metab Res Rev* **17**: 27-43.
4. Chung, B. H., J. H. Im, and H. R. Bowdon. 1986. Lipolysis-induced degradation of apolipoproteins B and E of human very low density lipoproteins. *J Biol Chem* **261**: 2960-2967.
5. Borén, J., S. Rustaeus, and S. O. Olofsson. 1994. Studies on the assembly of apolipoprotein B-100- and B-48-containing very low density lipoproteins in McA-RH7777 cells. *J Biol Chem* **269**: 25879-25888.
6. Oschry, Y., and S. Eisenberg. 1982. Rat plasma lipoproteins: re-evaluation of a lipoprotein system in an animal devoid of cholesteryl ester transfer activity. *J Lipid Res* **23**: 1099-1106.
7. Thrift, R. N., T. M. Forte, B. E. Cahoon, and V. G. Shore. 1986. Characterization of lipoproteins produced by the human liver cell line, Hep G2, under defined conditions. *J Lipid Res* **27**: 236-250.
8. Dashti, N., and G. Wolfbauer. 1987. Secretion of lipids, apolipoproteins, and lipoproteins by human hepatoma cell line, HepG2: effects of oleic acid and insulin. *J Lipid Res* **28**: 423-436.
9. Fazio, S., Z. Yao, B. J. McCarthy, and S. C. Rall Jr. 1992. Synthesis and secretion of apolipoprotein E occur independently of synthesis and secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins in HepG2 cells. *J Biol Chem* **267**: 6941-6945.
10. Dixon, J. L., and H. N. Ginsberg. 1993. Regulation of hepatic secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins: information obtained from cultured liver cells. *J Lipid Res* **34**: 167-179.
11. Fisher, E. A., N. A. Khanna, and R. S. McLeod. 2011. Ubiquitination regulates the assembly of VLDL in HepG2 cells and is the committing step of the apoB-100 ERAD pathway. *J Lipid Res* **52**: 1170-1180.
12. Meex, S. J. R., U. Andreo, J. D. Sparks, and E. A. Fisher. 2011. Huh-7 or HepG2 cells: which is the better model for studying human apolipoprotein-B100 assembly and secretion? *J Lipid Res* **52**: 152-158.
13. Tsai, J., W. Qiu, R. Kohen-Avraroglu, and K. Adeli. 2007. MEK-ERK inhibition corrects the defect in VLDL assembly in HepG2 cells: potential role of ERK in VLDL-ApoB100 particle assembly. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**: 211-218.
14. Guguen-Guillouzo, C., and A. Guillouzo. 2010. General review on in vitro hepatocyte models and their applications. *Methods Mol Biol* **640**: 1-40.
15. Parent, R., M.-J. Marion, L. Furio, C. Trépo, and M.-A. Petit. 2004. Origin and characterization of a human bipotent liver progenitor cell line. *Gastroenterology* **126**: 1147-1156.
16. Gripon, P., S. Rumin, S. Urban, J. Le Seyec, D. Glaise, I. Cannie, C. Guyomard, J. Lucas, C. Trepo, and C. Guguen-Guillouzo. 2002. Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 15655-15660.
17. Blight, K. J., J. A. McKeating, and C. M. Rice. 2002. Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* **76**: 13001-13014.
18. Bartosch, B., A. Vitelli, C. Granier, C. Goujon, J. Dubuisson, S. Pascale, E. Scarselli, R. Cortese, A. Nicosia, and F.-L. Cosset. 2003. Cell entry of hepatitis C virus requires a set of co-receptors that include the CD81 tetraspanin and the SR-B1 scavenger receptor. *J Biol Chem* **278**: 41624-41630.
19. Bartosch, B., and F.-L. Cosset. 2009. Studying HCV cell entry with HCV pseudoparticles (HCVpp). *Methods Mol Biol* **510**: 279-293.
20. Marion, M.-J., O. Hantz, and D. Durantel. 2010. The HepaRG cell line: biological properties and relevance as a tool for cell biology, drug metabolism, and virology studies. *Methods Mol Biol* **640**: 261-272.
21. Lecluyse, E. L., and E. Alexandre. 2010. Isolation and culture of primary hepatocytes from resected human liver tissue. *Methods Mol Biol* **640**: 57-82.

22. Olsavsky Goyak, K. M., E. M. Laurenzana, and C. J. Omiecinski. 2010. Hepatocyte differentiation. *Methods Mol Biol* **640**: 115-138.
23. Gibson, J. C., A. Rubinstein, P. R. Bukberg, and W. V. Brown. 1983. Apolipoprotein E-enriched lipoprotein subclasses in normolipidemic subjects. *J Lipid Res* **24**: 886-898.
24. Sainz, B., and F. V. Chisari. 2006. Production of infectious hepatitis C virus by well-differentiated, growth-arrested human hepatoma-derived cells. *J Virol* **80**: 10253-7.
25. Galbraith, R. A., S. Sassa, and H. Fujita. 1988. Regulation of heme synthesis in HepG2 human hepatoma cells by dimethyl sulfoxide. *Biochem Biophys Res Commun* **153**: 869-874.
26. Gripon, P., C. Diot, N. Thézé, I. Fourel, O. Loreal, C. Brechot, and C. Guguen-Guillouzo. 1988. Hepatitis B virus infection of adult human hepatocytes cultured in the presence of dimethyl sulfoxide. *J Virol* **62**: 4136-4143.
27. Wakita, T., T. Pietschmann, T. Kato, T. Date, M. Miyamoto, Z. Zhao, K. Murthy, A. Habermann, H.-G. Kräusslich, M. Mizokami, R. Bartenschlager, and T. J. Liang. 2005. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* **11**: 791-796.
28. André, P., F. Komurian-Pradel, S. Deforges, M. Perret, J. L. Berland, M. Sodoyer, S. Pol, C. Bréchet, G. Paranhos-Baccalà, and V. Lotteau. 2002. Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles. *J Virol* **76**: 6919-6928.
29. Lindenbach, B. D., P. Meuleman, A. Ploss, T. Vanwolleghem, A. J. Syder, J. A. McKeating, R. E. Lanford, S. M. Feinstone, M. E. Major, G. Leroux-Roels, and C. M. Rice. 2006. Cell culture-grown hepatitis C virus is infectious in vivo and can be recultured in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 3805-3809.
30. Mensenkamp, A. R., L. M. Havekes, J. A. Romijn, and F. Kuipers. 2001. Hepatic steatosis and very low density lipoprotein secretion: the involvement of apolipoprotein E. *J Hepatol* **35**: 816-822.
31. Mensenkamp, A. R., M. C. Jong, H. van Goor, M. J. van Luyn, V. Bloks, R. Havinga, P. J. Voshol, M. H. Hofker, K. W. van Dijk, L. M. Havekes, and F. Kuipers. 1999. Apolipoprotein E participates in the regulation of very low density lipoprotein-triglyceride secretion by the liver. *J Biol Chem* **274**: 35711-35718.
32. Mensenkamp, A. R., M. J. van Luyn, H. van Goor, V. Bloks, F. Apostel, J. Greeve, M. H. Hofker, M. C. Jong, B. J. van Vlijmen, L. M. Havekes, and F. Kuipers. 2000. Hepatic lipid accumulation, altered very low density lipoprotein formation and apolipoprotein E deposition in apolipoprotein E3-Leiden transgenic mice. *J Hepatol* **33**: 189-198.
33. Höpfner, M., D. Schuppan, and H. Scherübl. 2008. Growth factor receptors and related signalling pathways as targets for novel treatment strategies of hepatocellular cancer. *World J Gastroenterol* **14**: 1-14.
34. Gedaly, R., P. Angulo, J. Hundley, M. F. Daily, C. Chen, A. Koch, and B. M. Evers. 2010. PI-103 and sorafenib inhibit hepatocellular carcinoma cell proliferation by blocking Ras/Raf/MAPK and PI3K/AKT/mTOR pathways. *Anticancer Res.* **30**: 4951-4958.
35. Saito, H., P. Dhanasekaran, F. Baldwin, K. H. Weisgraber, S. Lund-Katz, and M. C. Phillips. 2001. Lipid binding-induced conformational change in human apolipoprotein E. Evidence for two lipid-bound states on spherical particles. *J Biol Chem* **276**: 40949-40954.

## **Supplementary Material & Methods**

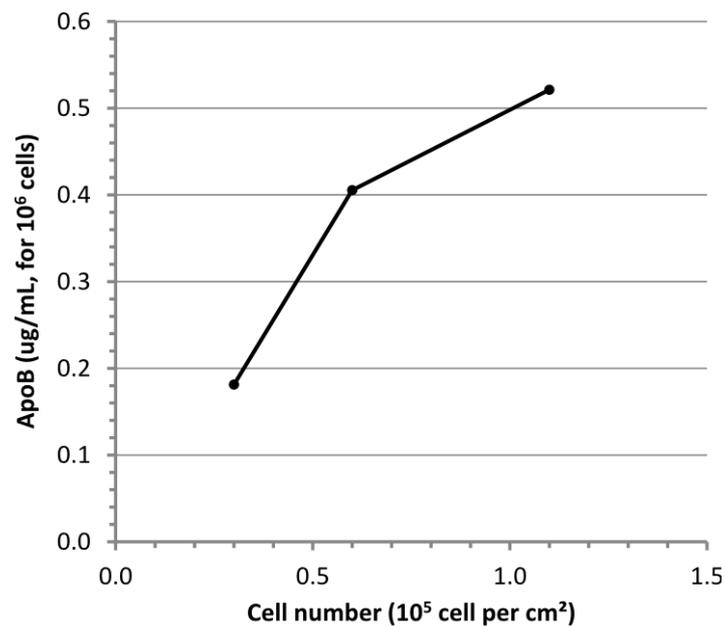
### ***Quantitative PCR***

Huh7.5 cells were seeded on 6-well plates. 2 % DMSO was added to cell culture medium when they reached confluence (at day 0). Culture medium was changed twice a week. At day 0, 4 and 8, intracellular RNA was extracted using Extract-All (Eurobio, Courtaboeuf, France) according to manufacturer's instructions. RNA samples were treated with RQ1 DNase (Promega, Madison, WI) and reverse-transcribed using M-MLV reverse-transcriptase (Life Technologies, Paisley, UK). Quantitative PCR was performed on a MyiQ Single-Color Real-Time PCR Detection System (BioRad, Hercules, CA) using EXPRESS SYBR GreenER qPCR SuperMix Universal (Life Technologies, Paisley, UK) and the following primers: albumin-F (CTGCACAGAATCCTTGGTGAAC), albumin-R (TTTGGGAACGTA TGTTCATCG), HNF4-F (TGCGGAAGAACCACATGTACTC), HNF4-R (GGCACTGGTTCCTCTGTCTTT). Results were normalized using two house-keeping genes:  $\beta$ -actin-F (TGGCATTGCCGACAGGATGC),  $\beta$ -actin-R (TCTGCTGGAGGTGGACAGCGA), RPLP0-F (CACCATTGAAATCCTGAGTGATGT), RPLP0-R (TGACCAGCCCAAAGGAGAAG).

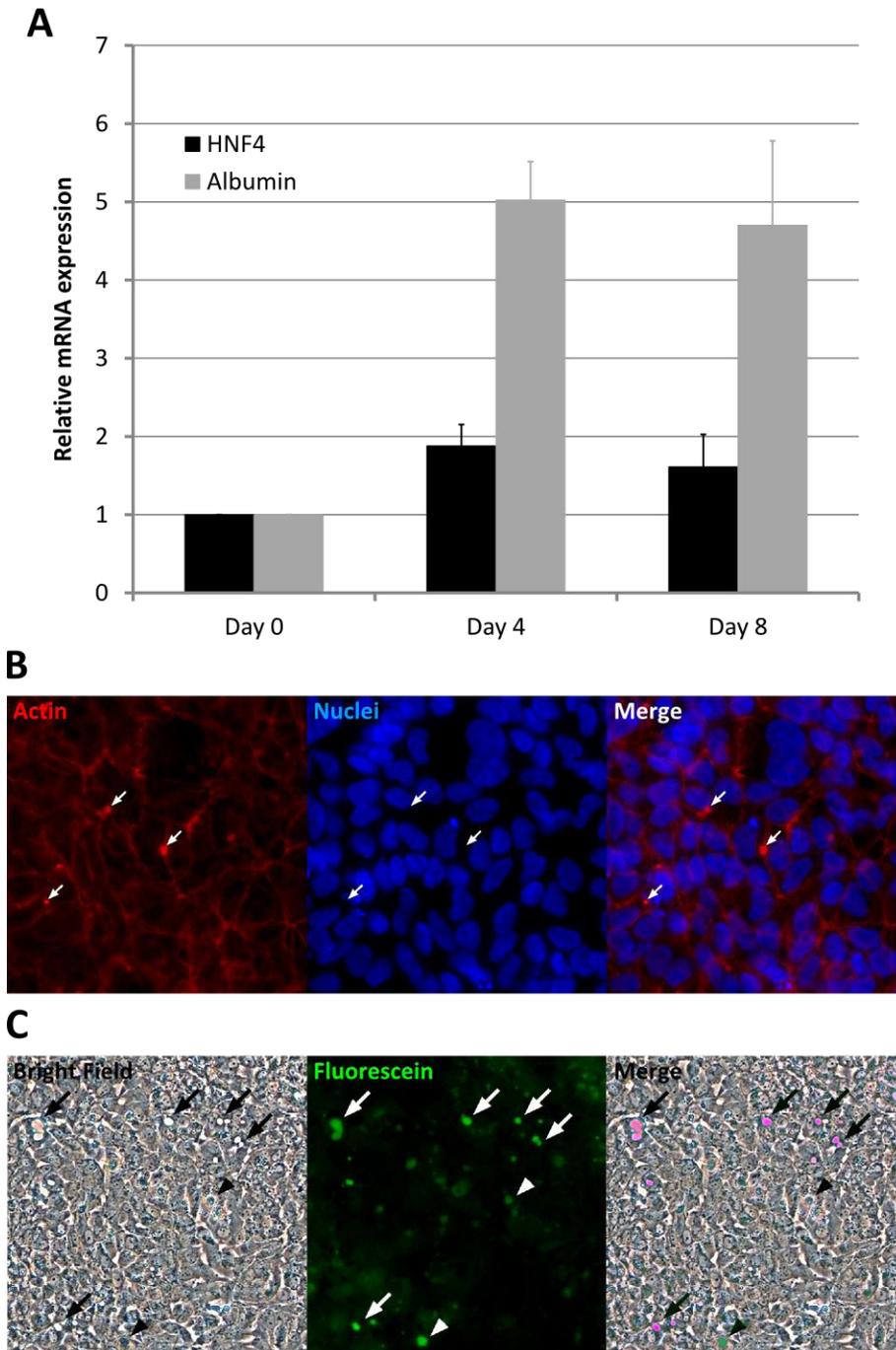
### ***Polarization determination***

Huh7.5 cells were seeded on 6-well plates containing one 13 mm glass coverslip per well. 2 % DMSO was added to cell culture medium when they reached confluence. Culture medium was changed twice a week. For actin staining, coverslips were harvested, washed in PBS and fixed with 4 % PFA in PBS for 20 min at room temperature. Fixed cells were washed twice with PBS and permeabilized with ice-cold acetone at -20°C for 5 min. After being washed in PBS, coverslips were incubated for 1 h at room temperature with 1 % bovine serum albumin and then actin was stained for 1 h at room temperature with Phalloïdin FluoProbe 547 (Interchim, Montluçon, France) diluted in PBS (1:40), and nuclei counterstained using Hoechst. For fluorescein staining of functional canaliculi, cells were incubated for 30 min in 5% CO<sub>2</sub> at 37°C with culture medium without serum and supplemented with 20  $\mu$ g/mL fluorescein (Sigma, Saint-Louis, MO, USA). Cells were then washed in the dark with pre-heated PBS and incubated another 5 min with pre-heated medium without serum. Cells were finally washed twice with pre-heated PBS and rapidly observed under a fluorescence microscope. For both observations, Nikon Eclipse TE2000-E fluorescence microscope, together with NIS-Elements BR software (Nikon Instruments, Amstelveen, Netherlands) were used.

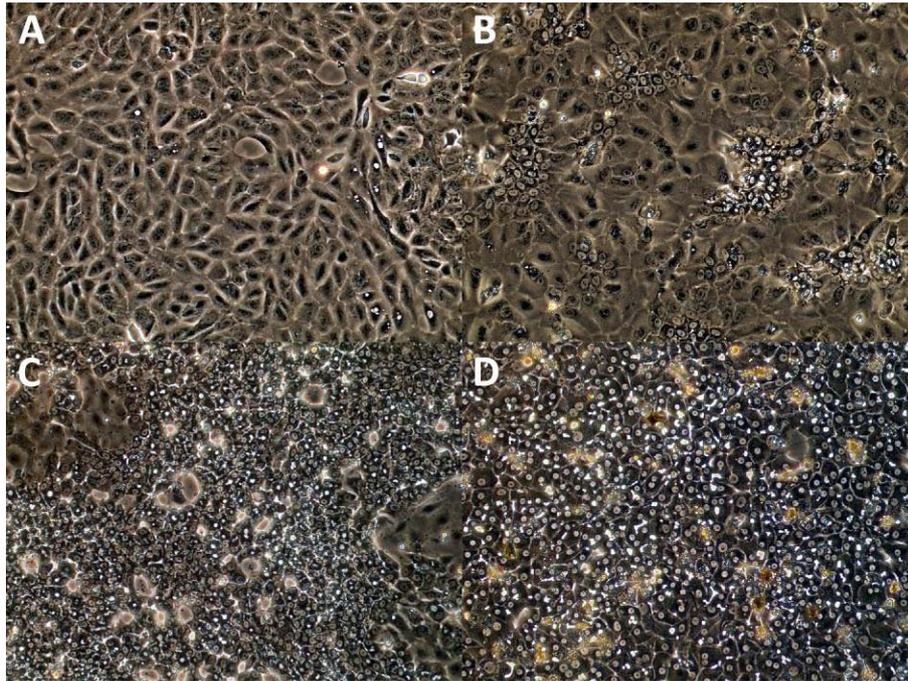
## Supplementary Figures



**Suppl. Fig. 1. Effect of Huh7.5 cell density on apoB100 secretion.** Huh7.5 cells were seeded at 1, 2 or 3.10<sup>4</sup> cells per cm<sup>2</sup> in 6-well plates. Culture medium was changed the next day for medium without serum. After 24h incubation, supernatants were harvested and quantified for apoB using ELISA. Results were normalized according to cell number.



**Suppl. Fig. 2. Characterization of Huh7.5 cell partial re-differentiation using DMSO.** 2 % DMSO was added to Huh7.5 cell culture medium when they reached confluence (at day 0). Culture medium was changed twice a week. (A) Relative quantification of albumin and HNF4 transcripts using RTqPCR at day 0, 4 and 8 after DMSO addition. (B) Actin cytoskeleton staining using phalloïdin (red) 3 days after DMSO addition. Nuclei were counterstained using Hoechst (blue). Local actin accumulations at bile canaliculi are shown (arrows). (C) Fluorescein accumulation in functional bile canaliculi (arrows). These accumulations colocalize with intercellular spaces (pink color in merge panel). Background fluorescein accumulation in cell debris is also observed (arrowheads, green color in merge panel).



**Suppl. Fig. 3. Morphological features of HepaRG cells.** HepaRG cells were cultured and differentiated as described in Material and Methods section. (A) Proliferative HepaRG cells, 2 days after confluence. (B) HepaRG cells differentiated in absence of EGF. (C) HepaRG cells differentiated in presence of 10 ng/mL EGF. (D) Primary human hepatocytes, one week after isolation.

## 4 Conclusion

L'analyse de la sécrétion lipoprotéique en hépatocytes primaires humains (PHH) confirme l'importance de la différenciation des hépatocytes sur la production de VLDL. En effet, les PHH sont capables de produire des particules de très faible densité, comportant à la fois apoB et apoE, c'est-à-dire des VLDL, pendant plus d'une semaine après isolation. Cependant, avec les conditions de cultures utilisées dans cette étude, cette production diminue fortement au cours du temps, pour disparaître au bout de deux semaines. La dédifférenciation progressive de la culture de PHH semble donc s'effectuer au détriment de sa capacité à produire des VLDL.

Ni les cellules Huh7.5, ni les cellules HepG2 ne semblent à même de produire des VLDL quand elles sont en prolifération, puisqu'aucune co-immunoprécipitation entre apoB et apoE n'est détectée. Néanmoins, les cellules HepG2 semblent tout de même supérieures aux cellules Huh7.5, dans la mesure où une stimulation avec de l'acide oléique et une inhibition de la voie de signalisation MEK/ERK permettent de rétablir une très faible densité de sécrétion d'apoB et d'apoE. Lorsque ces lignées d'hépatome sont redifférenciées partiellement pendant 4 jours en présence de 2% de DMSO, on observe par contre une bonne co-immunoprécipitation entre apoB et apoE, suggérant une sécrétion de VLDL. Cependant, la densité des lipoprotéines sécrétées par les cellules Huh7.5 est toujours trop élevée, se rapprochant plus de la densité des IDL, voire des LDL. Ainsi, la redifférenciation partielle des cellules d'hépatome Huh7.5 et HepG2 pourrait permettre la sécrétion de lipoprotéines plus physiologiques, de type VLDL, les cellules HepG2 restant un modèle plus pertinent que les cellules Huh7.5 qui pourraient présenter un défaut de maturation et de lipidation des lipoprotéines sécrétées.

Enfin, nous avons également montré que les cellules HepaRG, capables de se différencier en hépatocytes et en cholangiocytes sous l'action du DMSO, produisent des VLDL d'une qualité comparable aux PHH, mais en quantité moindre. Ces cellules non transformées pourraient donc représenter un modèle alternatif intéressant pour étudier le métabolisme, l'assemblage et la sécrétion des VLDL *in vitro*.



## CHAPITRE IV : Réplication d'un virus HCV tagué à la blasticidine dans des cellules HepG2 et caractérisation des particules virales sécrétées

### 1 Introduction

Comme nous l'avons vu au cours de l'introduction, le virus de l'hépatite C (HCV) semble associé *in vivo* aux lipoprotéines de faible et de très faible densité, formant des particules virales hybrides baptisées lipo-viro-particules (LVP) (André et al., 2002). Ces LVP contiendraient la nucléocapside virale, les glycoprotéines d'enveloppe virales, et au moins les apolipoprotéines B et E. L'existence de ces LVP est largement admise par la communauté HCV, même si l'association des virions avec apoB n'a pas été décrite *in vitro* (Bartenschlager et al., 2011; Herker and Ott, 2011). En effet, les études réalisées en utilisant la souche virale JFH1, adaptée à la culture cellulaire, et les cellules d'hépatome Huh7 (et dérivées) ont permis de démontrer l'association des particules virales avec apoE, jouant un rôle au cours de l'assemblage et de l'entrée des particules virales, mais pas avec apoB (Chang et al., 2007; Jiang and Luo, 2009; Cun et al., 2010; Merz et al., 2011).

Cette absence d'association entre HCV et apoB *in vitro* pourrait provenir d'une déficience des cellules Huh7 (et lignées dérivées) vis-à-vis de la synthèse de lipoprotéines. En effet, ces cellules ne semblent pas capables de produire des VLDL physiologiques (résultats personnels, cf. Chapitre III) (Icard et al., 2009; Meex et al., 2011). Ainsi, il est indispensable de développer de nouveaux modèles cellulaires de réplication du HCV, qui soient capables de produire des VLDL, afin de pouvoir étudier l'assemblage et la sécrétion des LVP. Les cellules HepG2 sont fréquemment utilisées pour étudier l'assemblage et la sécrétion des lipoprotéines et sécrètent des VLDL après stimulation à l'acide oléique et inhibition de la voie de signalisation MEK/ERK, suractivée dans ces cellules (résultats personnels, cf. Chapitre III) (Dixon and Ginsberg, 1993; Tsai et al., 2007; Meex et al., 2011). De plus, les cellules HepG2 ont fréquemment été utilisées pour étudier l'entrée (Bartosch et al., 2003; Harris et al., 2010; Fukuhara et al., 2011; Lupberger et al., 2011; Sainz et al., 2012b), la réplication virale (Date et al., 2004; Narbus et al., 2011; Sainz et al., 2012b), et leur impact sur la polarisation cellulaire (Mee et al., 2009, 2010). De nombreuses tentatives ont été réalisées pour essayer d'obtenir une réplication virale soutenue et productive en cellules HepG2 (Dash et al., 1997; Lim et al., 2002; McCormick et al., 2004; el-Awady et al., 2006; Narbus et al., 2011). Cependant, l'obtention d'une réplication durable, avec une production virale suffisante pour permettre la caractérisation des particules sécrétées, n'a pas encore été décrite. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à la mise en place d'une réplication virale forte et stable, compatible avec l'analyse de la sécrétion virale, dans la lignée cellulaire HepG2, capable de produire des VLDL, et donc potentiellement des LVP.

### 2 Approche expérimentale

Nous avons généré une lignée cellulaire possédant une permissivité accrue à HCV à partir de cellules HepG2 possédant un réplicon HCV sous-génomique. L'ARN viral a été éliminé de ces cellules, puis elles ont été infectées avec un virus JFH1 contenant un gène de résistance à la blasticidine, permettant ainsi la sélection des cellules répliquant activement le virus. Ce nouveau système nous a permis de caractériser la réplication virale, la production de particules virales infectieuses et leur association aux lipoprotéines de l'hôte, à l'aide de diverses techniques détaillées dans l'article ci-après.

## VLDL-producing and HCV-replicating HepG2 cells secrete apoE<sup>pos</sup>/apoB<sup>neg</sup> hybrid viral particles

**Running head:** ApoE<sup>pos</sup>/apoB<sup>neg</sup> HCV particle production by HepG2 cells

**Authors and affiliations:**

Baptiste Jammart,<sup>1</sup> Maud Michelet,<sup>1</sup> Eve Pécheur,<sup>2</sup> Romain Parent,<sup>1</sup> Birke Bartosch,<sup>1</sup> Fabien Zoulim,<sup>1,3</sup> and David Durantel<sup>1,#</sup>

<sup>1</sup>Inserm, U1052, Cancer Research Center of Lyon (CRCL), University of Lyon, Lyon, France

<sup>2</sup>IBCP, Lyon, France

<sup>3</sup>Hospices civils de Lyon (HCL), Lyon, France

**#Corresponding author:**

David Durantel, PhD

INSERM Unit 1052, CRCL, Team 15: Physiopathology of viral hepatitis

151 cours Albert Thomas, Lyon, Fr-69003

Tel: (+33) 472681992/Fax: (+33) 472681971/E-mail: [david.durantel@inserm.fr](mailto:david.durantel@inserm.fr)

**Electronic word count:** 11,137 (without references)

**Number of figures and tables:** 8 Figures, 2 Tables, 5 Supplementary Figures

**Financial support:** This work was supported by a grant from the French National Agency for Research against AIDS and viral hepatitis (ANRS; AO1-2008-CSS4) and by the INSERM core grant. BJ was recipient of a bursary from the French Ministry of Research and Higher Education and also from the "Association pour la Recherche sur le Cancer" (ARC).

## **Abstract**

Lipoproteins play a crucial role in hepatitis C virus (HCV) life cycle. In the plasmas of infected patients, lipo-viro-particles (LVP), defined as low-density viral particles associated with apolipoproteins B (apoB) and E (apoE), have been observed. This HCV-lipoprotein link has major implications for HCV assembly, secretion and entry. However, cell culture grown HCV virions (HCVcc), produced in Huh7 cells, which are deficient for very-low-density lipoprotein (VLDL) secretion, are only associated with and dependent on apoE, and not apoB, for assembly and infectivity. In contrast to Huh7 cells, HepG2 cells can be stimulated to produce VLDL by both oleic acid treatment and inhibition of the MEK/ERK pathway, but are not permissive for persistent HCV replication. Therefore, we developed here a new HCV cell culture model to study the interaction between HCV and lipoproteins, based on engineered HepG2 cells stably replicating a blasticidin-tagged JFH1 strain (JB). Control Huh7.5-JB, as well as HepG2-JB cell lines persistently replicated viral RNA and expressed viral proteins with a subcellular colocalization of dsRNA, core, gpE2 and NS5A compatible with virions assembly. Interestingly, Huh7.5-JB cells presented marked ultrastructural modifications similar to those observed in classically infected Huh7.5 cells, while HepG2-JB cells did neither show increased autophagy nor increased lipid droplet clustering or association with double-membrane vesicles. Intracellular RNA replication levels were increased in HepG2-JB cells upon DMSO treatment, MEK/ERK inhibition or NS5A overexpression, to levels similar to those observed in Huh7.5-JB cells. Both cell culture systems produced infectious viral particles, which were surprisingly biophysically and biochemically similar: they migrated at similar (high) densities on gradients, contained mainly apoE but not apoB and were not neutralized by anti-apoB antibodies. In conclusion, VLDL-producing HepG2 cells, secrete apoE positive but apoB negative infectious viral particles, which are indistinguishable from particles secreted by Huh7.5 cells. This suggests that there is no correlation between the ability of cells to simultaneously replicate HCV as well as secrete VLDL and their capacity to produce LVP.

## Introduction

A remarkable feature of chronic hepatitis C (CHC) infections resides in the tight interplay between viral replication and host gluco-lipidic metabolism. CHC is indeed associated with a high prevalence of insulin resistance (39, 64), which is also related to an increased prevalence of type 2 diabetes mellitus among HCV-infected patients (53, 84). CHC is also associated with an increased incidence of fatty liver (steatosis), which varies between 40 % and 80 % of patients depending on other risk factors (i.e. alcohol consumption, type 2 diabetes or obesity) (5, 68). Moreover, concomitantly to HCV-induced steatosis, hypobetalipoproteinemia is observed in 5 to 50 % of patients, depending on viral genotype (75, 83). Besides metabolic risk factors, HCV replication has also been associated with altered serum lipid and lipoprotein levels (68, 69). Indeed HCV-infected patients present lower cholesterol, triglyceride and low-density lipoprotein (LDL) levels (16), which normalize upon successful response to antiviral treatment (14). These tendencies are more evident in genotype 3a patients and have consequences on patient management as treatment responders have an increased risk of coronary heart disease (14). Evidence for a direct effect of HCV on lipid and lipoprotein secretion by hepatocytes was also obtained in mice expressing the HCV polyprotein at levels corresponding to natural viral infection (42).

A direct interaction between HCV and lipoproteins, was first described *in vivo* in 1992 when Thomssen and colleagues found that a substantial fraction of circulating HCV RNA could be immunoprecipitated by anti- $\beta$ -lipoprotein antibodies (87).  $\beta$ -lipoprotein-associated hybrid HCV particles are thought to be present in the form of large spherical low-density particles, rich in triglycerides and containing at least apolipoprotein B (apoB), HCV RNA and the viral core protein (3), and have been termed "lipo-viro-particles" (LVP). Further characterization of these LVP by immunoprecipitation studies revealed the presence of apolipoprotein E (apoE) in addition to apoB and HCV RNA, suggesting a close association of HCV particles with very-low-density lipoproteins (VLDL) (70). Interestingly, HCV particles seemed to be predominantly present in light, lipoprotein-rich sera fractions from patients in the post prandial state after a high fat meal (23). The concept of LVP is now widely accepted, although no association between HCV and apoB has yet been reported *in vitro* (7, 33).

*In vitro* studies on HCV were mainly performed with the Huh7 (and derived) cell line, infected by cell culture-adapted JFH1 viral strain (47, 90, 94) or derived chimeras such as Jc1 (76). Using these cell culture models, many reports have shown a strong association of HCV particles with apoE, which in contrast to apoB is thought to play a role in infectious particle formation and entry into host cells (12, 15, 34, 37, 58, 71). Interestingly, HCV particles produced in cell culture (HCVcc) have a relatively high density compared to their *in vivo* counterparts, with densities ranging from 1.10 to 1.18 g/mL. These particles are still infectious in chimpanzees, but their passaging in these animals leads to the generation of particles with lower density and increased specific infectivity (i.e.  $d < 1.10$  g/mL) (48). This experiment proved the importance of lipid association in HCV biology, and highlighted the need to develop *in vitro* cell culture models capable of producing LVP in order to further decipher their nature, composition and roles in HCV infection.

Unfortunately, Huh7 cells (and derived) have been recently shown to be deficient for the production of mature VLDL (36, 57), which could explain the absence of association between HCV and apoB (i.e. absence of LVP production) in this cell culture model. It is therefore necessary to

replicate HCV in cells competent for the production of VLDL, to get further insights on the potential association between various apolipoproteins and HCV. HepG2 cells have been extensively studied for lipoprotein assembly and secretion (20) and recent reports showed that HepG2 cells can secrete VLDL after oleic acid (OA) stimulation and inhibition of their over-activated MEK/ERK pathway (57, 88). Furthermore, HepG2 cells have been frequently used to study HCV, especially concerning viral entry (9, 25, 31, 51, 79), replication (18, 66, 79) and impact on cell polarization (55, 56). Several attempts to establish a stable and productive HCV replication in HepG2 cells were performed by using either inducible vector transfection (44), HCV RNA transfection (17), baculoviral transduction (54) or infection with patient sera (22). Recently it has been shown that ectopic expression of miR-122, a micro-RNA which is not endogenously expressed by HepG2 cells, is associated with an increased replication of HCV JFH1 (66). However, in this latter model, HCV replication and viral production did not reach high levels, thus precluding analysis of HCV assembly.

Because HepG2 cells produce more VLDL at high cell confluence, we asked whether optimization of long lasting HCV replication in HepG2 cells may allow production of LVP *in vitro*. To this end, a stable, polyclonal pool of HepG2 cells (HepG2-JB) that optimally replicate HCV were generated by antibiotic selection upon infection with a blasticidin-tagged JFH1 virus (JB). In HepG2-JB cells, genome replication, protein expression and subcellular localization, as well as viral particle production and association with lipoproteins were analyzed, and compared to control Huh7.5-JB cells.

## **Material & Methods**

### ***Reagents, antibodies & plasmids***

Chemicals were purchased from Sigma (Saint-Louis, MO, USA), unless otherwise specified. Tris(hydroxymethyl)aminomethane, sucrose and bovine serum albumin fraction V (BSA) were purchased from Euromedex (Mundolsheim, France). Complete protease inhibitor cocktail was purchased from Roche (Indianapolis, IN, USA). To-Pro-3 nucleic acid stain and HCS LipidTOX Deep Red neutral lipid stain were purchased from Molecular Probes (Life Technologies, Paisley, UK). Selection antibiotics blasticidin-S, zeocin and G418 were obtained from InvivoGen (San Diego, CA, USA). Protein G-coated magnetic beads (BioAdemabeads) were obtained from Ademtech (Pessac, France). HCV antiprotease (VX950) and antipolymerase (2-methyl-cytidine) were kindly provided by Pr. Neyts (Rega Institute, Leuven, Belgium).

IgG from goat and mouse sera were obtained from Sigma. Goat polyclonal anti-apoB (#ab27626) and anti-apoE (#ab7620) antibodies, rabbit polyclonal anti-V5 tag (#ab9116) and anti-BSD (#ab38307), and mouse monoclonal (MMAb) anti-apoE [E6D7] (#ab1907) and anti-HCV core protein [C7-50] (#ab2740) antibodies were purchased from Abcam (Cambridge, UK). Goat polyclonal anti-human apoB (#AF3556) was purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Rabbit polyclonal anti-beta actin antibody (#A0760-40A) was purchased from USBiological (Swampscott, MA, USA). MMAb anti-NS3 (#217-A) and anti-dsRNA [J2] were purchased from Virogen (Watertown, MA, USA) and Scicons (Hungary). MMAb anti-HCV E2 [AP33], anti-CD81 [JS81], and anti-apoB [4G3] were kindly given by Dr. Arvind H. Patel (Institute of Virology, Glasgow, UK) (72), Dr. Rubinstein (INSERM U1004, Villejuif, France), or purchased from the Heart Institute, Ottawa, Canada, respectively. Human monoclonal anti-HCV E2 antibody [CBH-5] was provided by Pr. Steven Fong (Stanford Blood

Center, Palo Alto, CA, USA) (30). Control VLDL were obtained from the floating phase of ultracentrifuged human plasmas (EFS, Lyon, France).

The plasmid enabling T7-mediated run-off transcription of HCV JFH1 strain, pJFH1, was kindly given by Dr. Wakita (National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan) (90). This plasmid was first modified, to derive pJFH1-CSK, by insertion of three mutations by site-directed mutagenesis (leading to following amino acids changes in JFH1 polyprotein: F172C, P173S, and N534K), to obtain a cell culture-adapted strain, which was previously described (19). For clarity reason this strain will be referred as JFH1 hereafter. Next, the sequence encoding the blasticidin resistance (BSD) was added within NS5A region between amino acids (AA) 2395-2396 of the polyprotein, i.e. a position that was described as tolerant for insertion of foreign sequences without affecting HCV replication (63). To this end the sequence AGATCTTCGCGAGTTTAAACGCGT, containing the restriction sites for BglII, NruI, PmeI, and MluI, was first inserted at position 7523 of the JFH1 genome by a PCR based strategy (details on request). Then a PCR product of the BSD ORF was cloned between BglII and MluI to derive pJFH1-CSK-BSD. The protein sequence at the insertion site was modified from MPP<sub>2395</sub>LEG to MPP<sub>2395</sub>RSTM-*seq* AA BSD-KTRLEG. Again for clarity reasons this strain will be name JFH1-BSD or JB strain hereafter.

### **Cell culture**

Huh7.5 cells were a kind gift from Dr. Charles M. Rice (The Rockefeller University, NY, USA) (11). HepG2 cells stably transduced with a lentiviral vector expressing CD81 were previously described (8, 9). The same lentiviral vector was used to derive other CD81-expressing HepG2-based lines. HepG2 cells stably replicating JFH1 subgenomic replicon (HepG2-SGR) were kindly provided by Dr. Takaji Wakita (National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan) (18). Cell culture medium and reagents were purchased from Life Technologies (Paisley, UK), unless otherwise specified. Fetal bovine serum FetalClone II (FCII; Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), was used for all cultures. Huh7.5 and HepG2 (and derived cells) were maintained in Dulbecco's modified Eagle medium (High glucose DMEM) containing 10 % FCII, 1x GlutaMAX, 1mM sodium pyruvate, 100 units/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin in 5 % CO<sub>2</sub>-normoxia incubator at 37°C. HepG2 cells were cultured on collagen coated surfaces (Type I collagen from rat tail; Sigma, Saint-Louis, MO, USA). HepG2-CD81 or HepG2-SGR cells and derived cell lines were maintained in presence of 500 µg/mL G418 sulfate.

### **Viral production and cell line generation**

The plasmid pJFH1-CSK-BSD was linearized by XbaI, treated by mung bean exonuclease, and purified with Macherey Nagel DNA purification minicolumn. The linearized DNA was *in vitro* transcribed using a MEGAscript T7 kit from Ambion (Life Technologies). Viral RNA was then delivered to Huh7.5 cells by electroporation as previously described (11). After 3 cell passages, infectious supernatants were harvested, clarified by centrifugation, 0.45 µm filtered, titered, and stored at -80°C until use.

Subgenomic JFH1 replicon was “cured” from HepG2-SGR cells by treatment over several passages with both IFN- $\alpha$  and anti-HCV polymerase drugs (i.e. 2-methyl-cytidine). The derived cell line, HepG2-cured (HepG2c), was then rendered positive for CD81 expression by stable transduction with a lentivirus carrying the CD81 gene together with a neomycin resistance gene as described previously (9). The resulting HepG2c-CD81 cell line was further modified by transduction with a lentivirus carrying a gene encoding a N-terminal truncated form of IRF3 (46); the resulting HepG2c-CD81-IRF3( $\Delta$ N) is deficient for the production of IFN- $\beta$  upon stimulation with the dsRNA prototypic

ligand poly-IC (data not shown). The NS5A gene from JFH1 was PCR amplified and cloned into the pLenti4-TO-zeocin vector from Invitrogen. Lentiviruses were generated with this plasmid according to manufacturer's protocol and used to generate cell lines with an enforced expression of a V5-tagged (in N-terminus) version of NS5A. Two cell lines were generated: Huh7.5-NS5A and HepG2c-CD81-IRF3( $\Delta$ N)-NS5A.

Wild type and various engineered Huh7.5 and HepG2 cells were infected with JFH1-BSD with a multiplicity of infection (MOI) of 1, and persistently replicating cells were selected with blasticidin at 20  $\mu$ g/mL. To prevent the selection of a particular clone, which might have a different genotype as compared to parental cells, persistently replicating cell lines were kept polyclonal (i.e. multiple colonies were mixed when a line was generated).

### ***Density gradient separation***

Cells at confluence were treated for 3 days with 2 % DMSO and then incubated another 24h in 5 % CO<sub>2</sub>-normoxia incubator at 37°C with fresh medium deprived of serum and containing either 10 % (v/v) of BSA-coupled oleic acid (10 mg/mL BSA and 300  $\mu$ M OA final) and 1  $\mu$ M U0126 (20 mM stock, diluted in DMSO), or 10 % (v/v) of BSA (10 mg/mL final) as a control. Supernatants were harvested (10 to 12 mL for a culture surface of 75 cm<sup>2</sup>), spun at 11,000 g for 5 min to remove cell debris, 0.45  $\mu$ m filtered, supplemented or not with protease inhibitors, and loaded on Amicon Ultracel 100K centrifugal filter units (Millipore, Billerica, MA, USA) to concentrate them according to the manufacturer protocol. Concentrated supernatant (1 mL) were loaded on pre-cast iodixanol-sucrose density gradients (see below for details) and ultracentrifuged for 10h at 55,000 rpm or at 40,000 rpm (lipoprotein or viral supernatant separation, respectively) and 4°C using SW 55 Ti rotor or SW 41 Ti rotor in Optima L-90K centrifuge (Beckman, Indianapolis, IN). Fractions were harvested from the top of the tube and their density was determined with a refractometer. Fraction volumes for lipoprotein or virus separation were respectively 400  $\mu$ L or 500  $\mu$ L for the 4 upper fractions and 1 mL for the others. Discontinuous iodixanol-sucrose density gradients were prepared by successive freezing of fractions ranging from 35 % or 54 % iodixanol to 6 % iodixanol. Each fraction contained 10 mM Tris HCl pH 8, 2 mM EDTA pH 8, iodixanol (OptiPrep density medium) and sucrose (each fraction was filled up to 1 mL with 0.25 M sucrose to keep osmolarity). Pre-cast density gradients were sawn for 24h at 4°C before use to obtain continuous density gradients.

### ***ApoB100 quantification***

ApoB100 was quantified in each fraction or in filtered culture supernatants using a commercial ELISA kit from AlerCHEK (Springvale, ME, USA) and following the manufacturer protocol.

### ***Apolipoprotein immuno-precipitations***

Harvested and filtered supernatants (0.5 to 1 mL, see above) were incubated with 4  $\mu$ g/mL of anti-apoB or anti-apoE antibodies (#ab27626 or #ab7620, respectively) or control IgG for 1h30 at room temperature, under agitation (1,000 rpm). Washed, protein G-coated magnetic beads (10  $\mu$ L for 1  $\mu$ g antibody) were then added and the supernatants were incubated for 1h30 at room temperature, under agitation. Magnetic beads were washed 5 times then resuspended with 50 to 100  $\mu$ L cold PBS supplemented with protease inhibitors for HCV RNA quantification.

### ***Drug treatment & HCV RNA quantification***

JFH1-BSD-replicating cells were seeded on 6-well culture plates and kept 3 days after confluence by adding 2 % DMSO to the culture medium. Then cells were incubated another 24h with

medium containing 2 % DMSO and different drug concentrations to assess the effect of drug treatment on HCV RNA levels. Briefly we treated the cells with 0, 0.5, 1 and 2 % ethanol, or 0, 25, 50 and 100  $\mu$ M chenodeoxycholic acid (CDCA), or 0, 2.5, 5 and 10  $\mu$ M U0126, with or without 10 % oleic acid.

Total intracellular RNA was extracted using Extract-All (Eurobio, Courtaboeuf, France) according to manufacturer's protocol. Extracellular RNA was extracted from 150  $\mu$ L of 0.45  $\mu$ m filtered supernatants, from 150  $\mu$ L of each fraction of density gradients or from 10 to 20  $\mu$ L of immunoprecipitated samples, using NucleoSpin RNA Virus kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) according to manufacturer's protocol. HCV RNA absolute quantification was performed by quantitative RT-PCR with OneStep EXPRESS SYBR GreenER RTqPCR SuperMix kit (Life Technologies, Paisley, UK), on a MyiQ Single-Color Real-Time PCR Detection System (BioRad, Hercules, CA). The amplification was performed with previously described #RC1 and #RC21 primers (40).

### ***Viral infectivity determination***

Viral infectivity was determined in each fraction of density gradients using TCID<sub>50</sub> method, as previously described (47). Viral infectivity in culture supernatants was determined as focus forming units (FFU/mL). Briefly,  $2 \cdot 10^4$  Huh7.5 cells per cm<sup>2</sup> were seeded on 48-well culture plates and infected the next day with serial dilutions of infectious supernatants. Three days after infection, cells were fixed with ice-cold methanol/acetone (v/v) solution for 30 min at -20°C and processed for immunofluorescent detection of HCV core antigen. Core-positive infectious foci were quantified for highest dilutions and infectious titer was thus determined.

### ***Neutralization assay***

Two different readouts were used to analyze antibody-mediated neutralization of viral supernatants infection: supernatant infectivity (FFU/mL) and viral RNA entry (intracellular RT-qPCR after 4h infection). Briefly, naïve Huh7.5 cells were seeded on 48-well or 6-well plates ( $2 \cdot 10^4$  /cm<sup>2</sup> or  $8 \cdot 10^4$  /cm<sup>2</sup>, respectively). The next day, serum-free viral supernatants were incubated for 2h at room temperature with neutralizing antibodies or control IgG, i.e. MMAb anti-apoB [4G3] (10, 2 and 0.4  $\mu$ g/mL), MMAb anti-CD81 [JS-81] (10  $\mu$ g/mL) or control IgG from mouse (10  $\mu$ g/mL). For CD81 neutralization, naïve cells were also incubated with anti-CD81 antibodies (1  $\mu$ g/mL) before and during infection. Virus/antibody mixture was then incubated for 4h at 37°C with naïve Huh7.5 cells (100  $\mu$ L of serial dilutions for infectivity determination, 500  $\mu$ L for RNA entry determination). Cells were then washed with PBS and processed for FFU determination or washed 3 times with PBS and processed for intracellular RNA quantification.

### ***Northern blotting***

Purified RNA were glyoxylated, migrated into agarose gel in phosphate buffer, transferred onto positively charged nylon membrane in SSC 20X buffer, and subjected to Northern blotting with a radioactively labeled ( $P^{32}$  CTP) negative probe (i.e. complementary to HCV positive strand and corresponding to 5'UTR sequence) following standard procedures (81). Briefly, a PCR amplicon was generated with primers T3-JFH1-fr (AAAATCTAGAAATTAACCCTCACTAAAGGGACCTGCCCTAATA GGGGCGACTCC) and T7-JFH1-rv (AAAATCTAGATAATACGACTCACTATAGGGAGAGCCTCGGGGGG ACAGGAGCCATCC), which contain respectively T3 and T7 polymerase sequences (in bold). The PCR amplicon was used as template for *in vitro* transcription using MAXIscript kits from Ambion (Life Technologies) in presence of radioactive  $P^{32}$ -CTP (GE Healthcare) according to manufacturer's instructions. A negative probe (i.e. hybridizing with positive HCV RNA) was generated with the T7

polymerase. Pre-hybridization and hybridization were performed in Hybridization buffer from Ambion at 65°C in rotary oven and the probe was used at least at 10<sup>6</sup> cpm/mL. Washes were performed with non stringent buffer (2X SSC-1 % SDS) at room temperature and stringent buffer (0.1X SSC-1 % SDS) at 65°C. The membrane was then exposed to Kodak film and developed with conventional methods.

### ***Western blotting***

Cell lysates, density gradient fractions or immunoprecipitates were denatured 5 min at 95°C in Laemmli buffer and proteins were separated using SDS-PAGE. After blotting on a nitrocellulose membrane, apoB100 and apoE proteins were revealed using respectively a goat polyclonal anti-apoB antibody (#AF3556, 1:1000 dilution) and a mouse monoclonal anti-apoE [E6D7] antibody (1:500 dilution). HCV proteins core, E2 and NS3 were revealed using mouse monoclonal antibodies (1:500 dilutions). V5-tagged or BSD-tagged NS5A proteins were revealed using rabbit polyclonal antibodies (1:500 dilutions). For cell lysates, equal loading was control by revealing  $\beta$ -actin with a rabbit polyclonal antibody (1:250 dilution). Anti-goat, anti-rabbit and anti-mouse antibodies coupled to horseradish peroxidase were used to detect proteins by enhanced chemiluminescence.

### ***Immunofluorescence***

Cells were seeded on glass coverslips and kept 3 days after confluence by adding 2 % DMSO to the medium. Coverslips were then washed in PBS and fixed for 20 min at room temperature with 4 % paraformaldehyde (PFA) in PBS and permeabilized with saponin. Fixed cells were washed in PBS and a blocking step in PBS containing 4 % bovine serum albumin (PBS-BSA) was performed, followed by incubation with primary antibodies in PBS-BSA for 1h30. Mouse monoclonal anti-HCV core (C7-50, 1:400 dilution) and anti-dsRNA (J2, 0.5  $\mu$ g/mL) antibodies, human monoclonal anti-HCV E2 (CBH-5, 1:500 dilution) antibody and rabbit polyclonal anti-V5 tag (1:500 dilution) and anti-BSD (1:500 dilution) antibodies were used. Cells were washed three times in PBS and incubated with respective secondary antibodies coupled to either Alexa-488 or Alexa-555 fluorescent probes (Life Technologies) diluted 1:2000 in PBS-BSA for 1h. Cells were then washed twice with PBS and incubated another 30 min in PBS containing either 1:400 LipidTOX neutral lipid stain or 1:2000 To-Pro-3 to stain lipid droplets or nucleic acid, respectively. Coverslips were finally washed in PBS and mounted on glass slides using fluorescence mounting medium (Dako, Glostrup, Denmark) for analysis. Pictures were taken with a Zeiss LSM 510 Meta confocal microscope (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Germany). Cell counting, image processing and montage were performed with ImageJ software (National Institute of Health, USA).

### ***Electron microscopy***

For electron microscopy experiments on JFH1-infected Huh7.5 cells, naïve cells were plated on 35mm Petri dishes and incubated with medium containing 2 % DMSO when they reached confluence. After 3 days of DMSO treatment, cells were infected overnight with JFH1 virus at a MOI of 0.05 (day 0). 6 days and 10 days after infection, when respectively 35 and 80 % of the cells were infected (HCV core staining), they were further processed for ultrastructural characterization by transmission electron microscopy (TEM). For electron microscopy experiments on JFH1-BSD replicating Huh7.5 and HepG2 cells, cells were treated 3 days with DMSO after confluence and further processed for TEM. Briefly, cells were fixed by incubation with 2 % paraformaldehyde and 2.5 % glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer pH 7.4, for 30 min at room temperature. They were extensively washed (5 times, 5 min each) with sodium cacodylate buffer. Cells were then post-fixed by

incubation with 2 % v/v osmium tetroxide in cacodylate buffer for 45 min and processed by dehydration in a series of ethanol solutions for embedding in epoxy resin. TEM examination was performed on a Philips CM120 microscope and images were acquired with an ORIUS SC200D CCD camera (Gatan Inc.). Images were analyzed using ImageJ software to measure cell and autophagic structures surfaces, as well as lipid droplet apparent diameter.

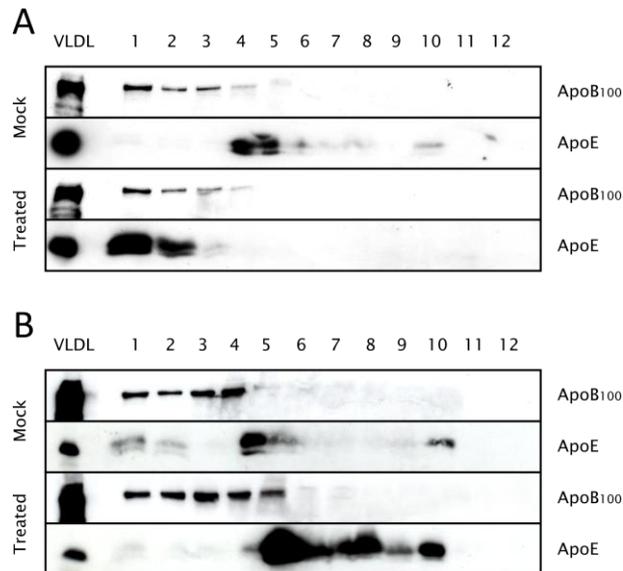
## **Results**

### ***In vitro-differentiated HepG2-CD81 but not Huh7.5 cells secrete very-low-density lipoproteins***

HepG2 cells have been shown to produce apoB100 in the very-low-density range, when stimulated with oleic acid (OA) and treated with a MEK/ERK inhibitor (U0126) (57, 88). In contrast, Huh7 cells produce mainly intermediate-density lipoprotein (IDL) and are insensitive to MEK/ERK inhibition (57). HepG2 cells may therefore represent a better model to study the assembly of LVP *in vitro*. To confirm these observations with HCV-permissive cell lines (i.e. HepG2-CD81 and Huh7.5 cells), we analyzed the density repartition of apoB100 by ELISA and immunoblotting following density separation. We found similar results with our proliferating cells, thus suggesting that neither the cloning procedure for Huh7.5 cells, nor the lentiviral transduction performed to express CD81 in HepG2 cells did affect their respective lipoprotein secretion phenotype (data not shown).

*In vivo*, VLDL are secreted by differentiated hepatocytes. When cultured in basal conditions and kept in proliferation, Huh7 and HepG2 cells are far from differentiated, however it has been shown that they could be partially re-differentiated by treatment with DMSO (26, 78). Thus, to characterize VLDL production in more physiological conditions, we analyzed apoB100 secretion in partially re-differentiated HepG2-CD81 and Huh7.5 cells after 4-day incubation with 2 % DMSO. Since physiological VLDL are positive for both apoB100 and apoE, we also analyzed apoE secretion to monitor the presence of both apolipoproteins on lipoprotein particles. We incubated both cell types for 3 days in DMSO-containing medium and proceeded to another 24h incubation in presence of DMSO and in presence of 10 % BSA-coupled OA with 1  $\mu$ M U0126, or 10 % BSA as a control. Harvested supernatants were concentrated and separated over a iodixanol-sucrose gradient. We assayed each fraction for the presence of apoB100 and apoE by immunoblotting. While the density repartition pattern of apoB100 and apoE was similar for both DMSO-treated Huh7.5 and HepG2-CD81 cells, it appeared clearly different when cells were treated with OA and U0126 in addition to DMSO. Indeed DMSO and OA/U0126-treated HepG2-CD81 cells secreted most of their apoB100 and apoE in VLDL density range ( $d < 1.006$  g/mL, fractions #1 to 3) (Fig. 1A), whereas Huh7.5 cells showed a poor co-sedimentation between apoB100 and apoE apolipoproteins (Fig. 1B). This result suggests that, even if partially re-differentiated Huh7 (and derived cells) can produce part of their apoB100 in VLDL density range, they are definitely not capable to produce apoB100 and apoE double-positive lipoproteins in contrast to HepG2 cells.

In conclusion, DMSO and OA/U0126-treated HepG2 cells appear to be best-suited to study the production of LVP *in vitro*. Therefore we focused on establishing persistent HCV replication in these HepG2 cells to analyze viral particle production after partial cell re-differentiation with DMSO.



**Fig. 1.** ApoB100 and apoE secretion in partially re-differentiated hepatoma cells. HepG2-CD81 or Huh7.5 cells were seeded on 100 mm Petri dishes. At confluence, cells were treated for 3 days with 2 % DMSO and incubated another 24h with medium without serum containing 2 % DMSO, 10 % (v/v) OA-BSA and 1  $\mu$ M U0126 (Treated) or containing 2 % DMSO and 10 % (v/v) BSA (Mock). Supernatants (10 mL) were harvested, 0.45  $\mu$ m filtered, concentrated and subjected to density separation on iodixanol-sucrose gradients (low density fractions on the left). (A) ApoB100 and apoE immunoblotting in each fraction for HepG2-CD81 cells. (B) ApoB100 and apoE immunoblotting in each fraction for Huh7.5 cells. VLDL = control VLDL from human serum.

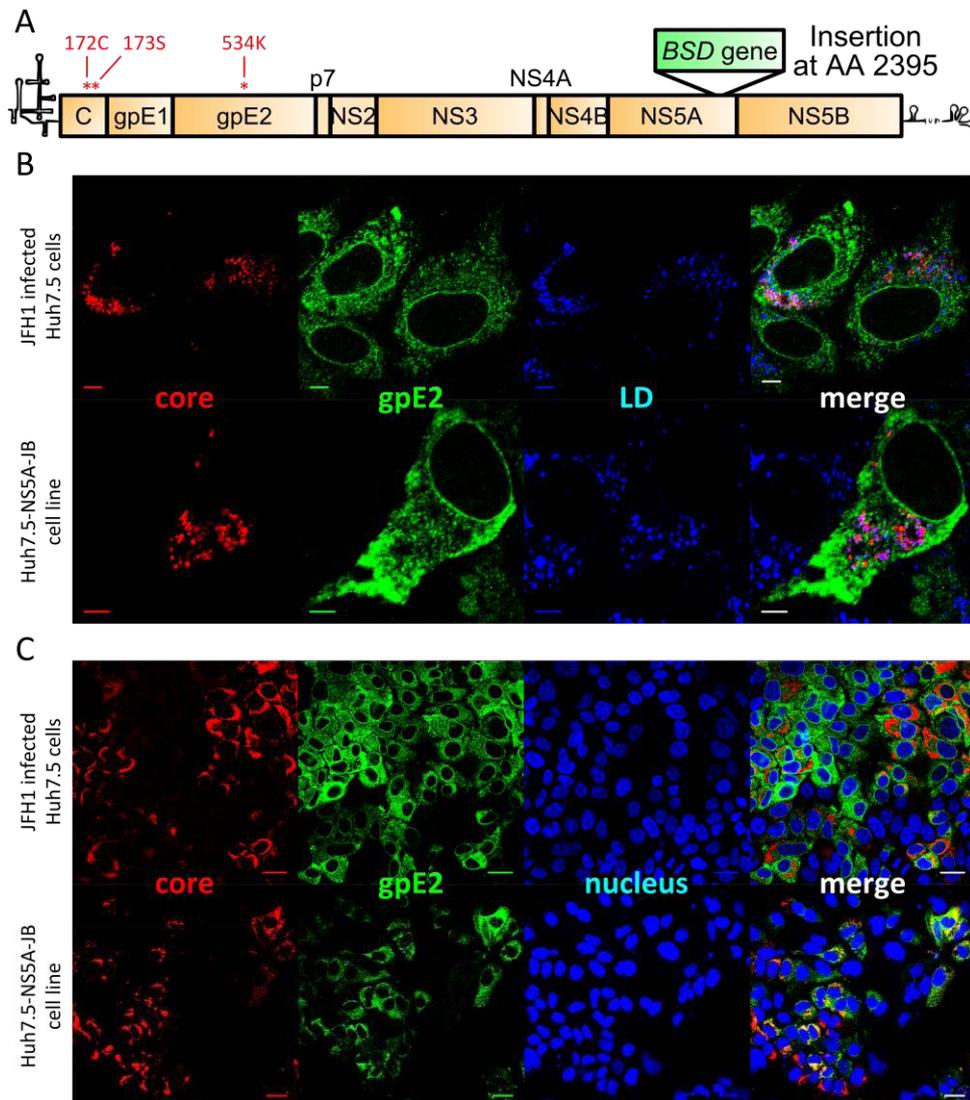
### ***Blasticidin-tagged JFH-1 virus replicate and propagate in Huh7.5 cells***

In order to establish a chronic viral infection in HepG2 cells, we first engineered a cell culture-adapted blasticidin-tagged JFH1 virus as described in material and methods section and schematized in Figure 2A. The blasticidin resistance gene was inserted at position 2395 of the polyprotein in domain III of NS5A, since this insertion position was previously described by others and did not impair HCV RNA replication (63). However, as Appel and colleagues reported that domain III was requested for HCV assembly (4), we anticipated a hypothetical assembly defect in replicating cells due to BSD insertion and created various Huh7.5 and HepG2 (and derived) cell lines over-expressing a V5-tagged version of NS5A. The expression of NS5A-V5 was verified in these cells by immunofluorescence and western blotting (data not shown, and Fig. 3C).

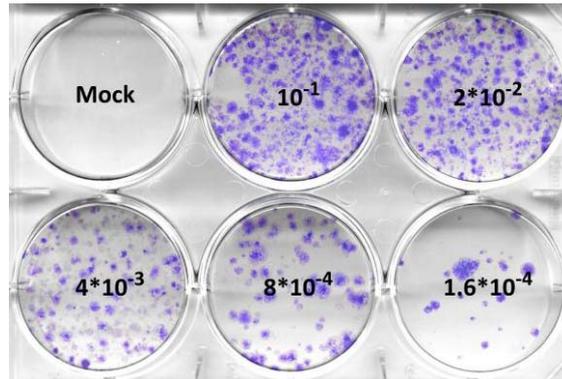
To check the functionality of our recombinant JFH1-BSD (referred hereafter as JB) strain, *in vitro* transcribed RNA was electroporated into Huh7.5 cells and supernatants were collected over a period of one week and pooled to generate an infectious viral stock. Naïve Huh7.5-NS5A cells were then infected with various dilutions of JB virus and selected for viral replication using blasticidin in colony forming unit assays (Suppl. Fig. 1). A cell line, named Huh7.5-NS5A-JB, was established by mixing all blasticidin-resistant clones. These cells were maintained under antibiotic selection and kept replicating HCV RNA at similar levels than JFH1-infected Huh7.5 cells ( $10^6$  to  $10^7$  viral RNA copies per  $\mu$ g of total intracellular RNA). When comparing stably replicating Huh7.5-NS5A-JB cells with freshly JFH1-infected Huh7.5 cells, we observed comparable levels of expression and similar subcellular localization of viral structural proteins E2 and core (Fig. 2B, C). Indeed, HCV core protein,

when detected, was mainly localized around lipid droplets (LD) whereas gpE2 glycoprotein showed a reticular localization pattern (Fig. 2B). It is worth noting that in the Huh7.5-NS5A-JB cell line, not all cells were positive for either core or gpE2 in IF (Fig. 2C, Suppl. Fig. 2). Eventually, Huh7.5-NS5A-JB cells produced infectious viral particles although viral titer was 10 times lower as compared to JFH1-infected Huh7.5 cells ( $1.5 \times 10^4$  FFU/mL compared to  $10^5$  FFU/mL).

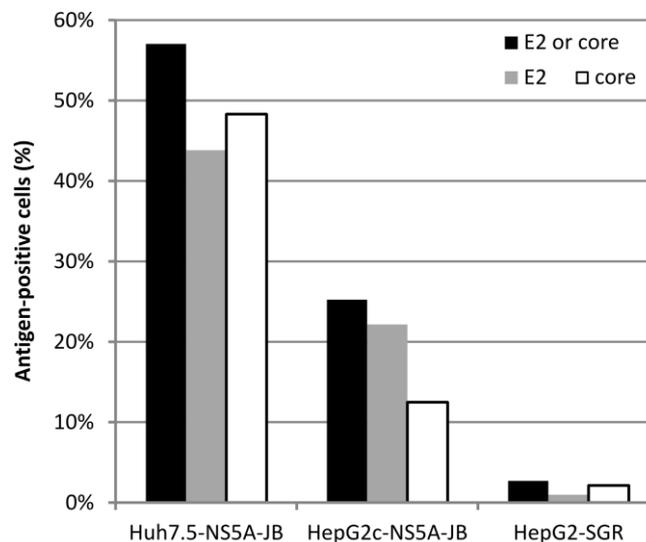
To summarize, we have shown that the JFH1-BSD (JB) recombinant viral strain is infectious in Huh7.5 cells, can persistently infect Huh7.5 cells upon blasticidin selection, and persistently secrete virions in the supernatants.



**Fig. 2.** Viral protein expression in JB-replicating Huh7.5 cells. Naïve Huh7.5 cells were infected with JFH1 virus and immunofluorescence (IF) staining was performed to detect viral structural proteins. Naïve Huh7.5-NS5A cells were infected with JB virus, stable viral replication was selected by blasticidin, and IF staining was performed to detect viral structural proteins. (A) Schematic representation of JB viral genome containing BSD-resistance gene insertion in the C-terminal domain of NS5A at position 2395 (in polyprotein amino-acid sequence) (B) Immunofluorescent detection of HCV core (red) and gpE2 (green) proteins with lipid droplet stain (blue). Scale bar = 5  $\mu$ m. (C) Immunofluorescent detection of HCV core (red) and gpE2 (green) proteins with nucleus counterstain (blue). Scale bar = 25  $\mu$ m.



**Suppl. Fig. 1.** Selection of JB-replicating Huh7.5-NS5A cells. Naïve Huh7.5-NS5A cells were infected with increasing dilutions of JB virus ranging from  $10^{-1}$  to  $1.6 \times 10^{-4}$  and selected with  $10 \mu\text{g/mL}$  blasticidin for around 7 days. Colony formation at each dilution was revealed by crystal violet stain.



**Suppl. Fig. 2.** Viral protein expression in JB-replicating Huh7.5-NS5A and HepG2c-NS5A cells. HepG2-SGR cells or JB-replicating Huh7.5-NS5A and HepG2c-NS5A cells were treated for 3 days with DMSO after confluence and further processed for immunofluorescent detection of viral structural core and gpE2 proteins using specific antibodies. Nuclei were counterstained with To-Pro-3. 6 pictures (about 1000 cells) were acquired on a confocal microscope for each condition, and nuclei, as well as core-positive and gpE2-positive cells were counted using ImageJ software. Results are presented as mean percentage of viral protein-positive cells.

### ***Cured HepG2-CD81 cells can stably replicate a blasticidin-tagged JFH1 strain***

Unlike Huh7.5 cells, HepG2-CD81 cells are capable of producing VLDL as shown before, and in other reports (57, 88). Therefore, we aimed at replicating HCV in HepG2-CD81 cells in order to study the potential secretion of LVP *in vitro*. Several attempts to replicate HCV in HepG2-CD81 cells with various approaches were unsuccessfully performed in our laboratory, including HCV RNA transfection or electroporation, baculovirus-mediated delivery of full-length HCV genome, or high MOI infection using cell-culture adapted JFH1 viruses and HepG2 cells partially invalidated in IFN responses. None

of these attempts permitted a high and sustained HCV replication, necessary for viral particle production characterization by biochemical means. These failed attempts could be partially explained by the induction of a type I interferon response against the virus in HepG2 cells (data not shown) and/or the suboptimal expression of the proviral miR-122 in HepG2 and derived lines (66).

To obtain stably replicating HepG2 cells, we infected various HepG2-CD81 lines with Huh7.5-produced JB virus and selected them with blasticidin. A transient replication, but no stably replicating cell line, was obtained with either HepG2-CD81 or HepG2-CD81-shIFN $\beta$ -shIFNAR1 (a cell line invalidated for IFN response as previously reported (50)), suggesting that ATCC-derived HepG2 cells, even when invalidated for IFN response, were not capable to sustain HCV replication (Table 1). Stably-replicating HepG2 cells were obtained only with cured HepG2 cells which had previously replicated subgenomic HCV replicons. Those cured HepG2 cells were obtained by removal of JFH1 subgenomic replicon from HepG2-SGR cells (18) using IFN $\alpha$ -2b and anti-polymerase treatments. As for Huh7.5 cells, which were also obtained by clearance of a HCV subgenomic replicon, cured HepG2 cells present cellular adaptations to viral replication (85). Further modifications were made, using lentiviral transduction, to express CD81 and/or NS5A and/or IFR3( $\Delta$ N), a dominant negative form of interferon regulatory factor 3 (IRF3) lacking its DNA binding domain and blocking the synthesis of IFN- $\beta$  mRNA (46). The most permissive lines, amongst HepG2 derived cells, were HepG2-cured-CD81-IFR3( $\Delta$ N) cell lines expressing or not V5-tagged NS5A (named hereafter HepG2c and HepG2c-NS5A) (Table 1). Three HepG2 derived cell lines were established, named HepG2c-JB, HepG2c-NS5A-JB#1 and HepG2c-NS5A-JB#2, and use to study HCV replication and viral particle production in VLDL-producing cells. Cell lines Huh7.5-JB and Huh7.5-NS5A-JB were used as controls.

**Table 1.** Generation of HCV-replicating Huh7.5 and HepG2 cell lines

Naïve cell lines	BSD-resistant colonies <sup>a</sup>	BSD-resistant cell lines <sup>b</sup>
Huh7.5	> 10,000	YES
Huh7.5-NS5A	> 10,000	YES
HepG2-CD81	transient survival <sup>c</sup>	NO
HepG2-CD81-shIFN $\beta$ -shIFNAR1	25	NO
HepG2-cured-CD81	500	YES
HepG2-cured-CD81-NS5A	300	YES
HepG2-cured-CD81-IRF3( $\Delta$ N)	800	YES
HepG2-cured-CD81-IRF3( $\Delta$ N)-NS5A	800	YES
Differentiated HepaRG cells	transient survival <sup>c</sup>	NO
PHH	transient survival <sup>c</sup>	NO

<sup>a</sup> Approximate number of BSD-resistant colonies (extrapolated from the highest positive viral dilution)

<sup>b</sup> Successful establishment of a BSD-resistant polyclonal cell line

<sup>c</sup> Transient survival to BSD for up to 1 week, followed by cell death without stable resistance

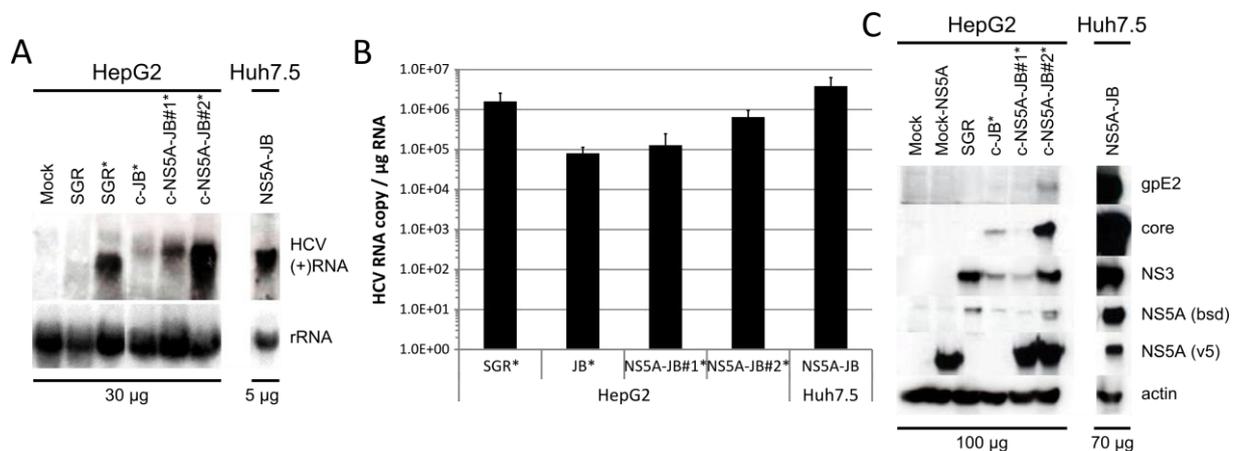
It is worth noting that differentiated HepaRG cells, an hepatic bipotent progenitor cell line (52, 73), or freshly isolated primary human hepatocytes (PHH) showed only a transient resistance to blasticidin, but no stable cell lines could be obtained, thus confirming that “immunocompetent” (i.e.

not impaired in cellular innate immunity) cells cannot be persistently infected with selectable HCV strains *in vitro* (Table 1).

### HepG2c-JB cells replicate HCV at lower levels than Huh7.5-NS5A-JB cells

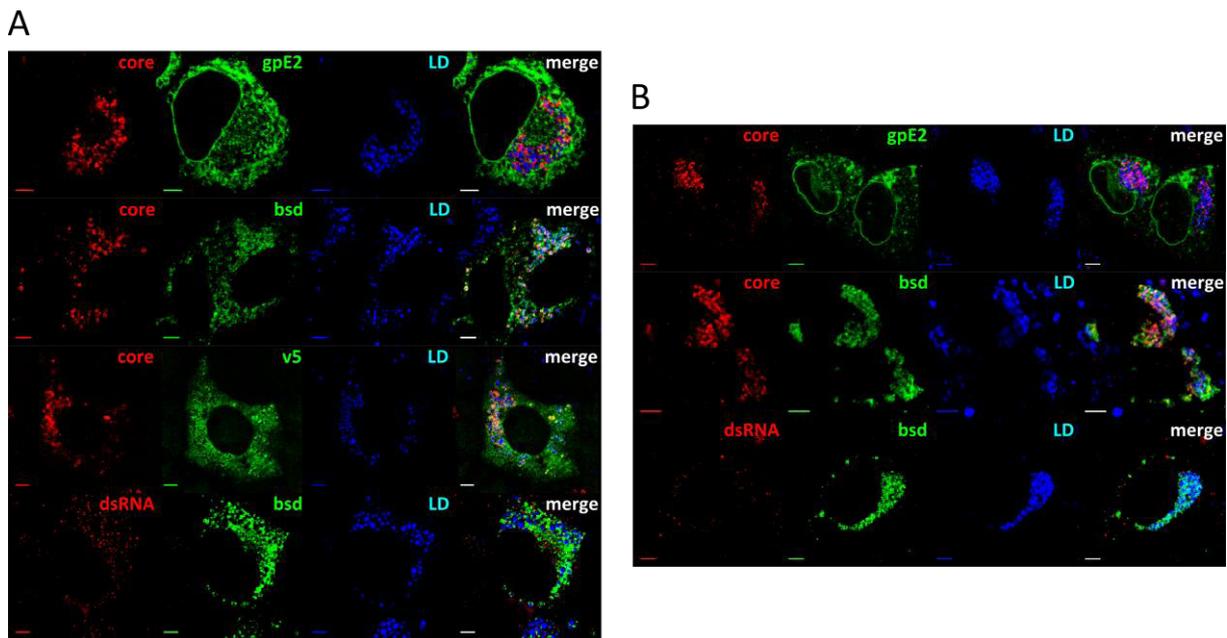
With these tools in hands, we characterized HCV replication in both Huh7.5-NS5A-JB cells and HepG2c-JB cells, expressing or not V5-tagged NS5A protein, in terms of viral RNA replication and viral protein expression. HCV (+)RNA was detected by northern blotting in all cell lines at the expected size (Fig. 3A). Levels of accumulated intracellular viral (+)RNA were different for each cell line, with a higher level for NS5A-trans-complemented HepG2c-JB cells. HCV RNA quantification using one-step quantitative RT-PCR showed similar results with up to  $5 \cdot 10^5$  viral RNA copies per  $\mu\text{g}$  of cellular RNA for HepG2c-NS5A-JB#2 (Fig. 3B). However, HCV RNA replication was still lower compared to HepG2-SGR cells or Huh7.5-NS5A-JB cells.

Next, we investigated viral protein expression and localization. Structural proteins gpE2 and core, as well as non-structural proteins NS3 and BSD-tagged NS5A were highly expressed in Huh7.5-NS5A-JB cell lines, as shown by protein immunoblotting (Fig. 3C). V5-tagged NS5A protein was also detected in trans-complemented Huh7.5-NS5A-JB and HepG2c-NS5A-JB cells. Viral proteins were hardly detected by immunoblotting in HepG2c-JB cells, suggesting a lower viral protein expression in HepG2c compared to Huh7.5 cells (Fig. 3C). Nevertheless, HCV gpE2, core, NS3 and BSD-tagged NS5A proteins could be detected in HepG2c-NS5A-JB#2 cells, and this cell line was thus used for the following experiments, and called hereafter HepG2c-NS5A-JB.



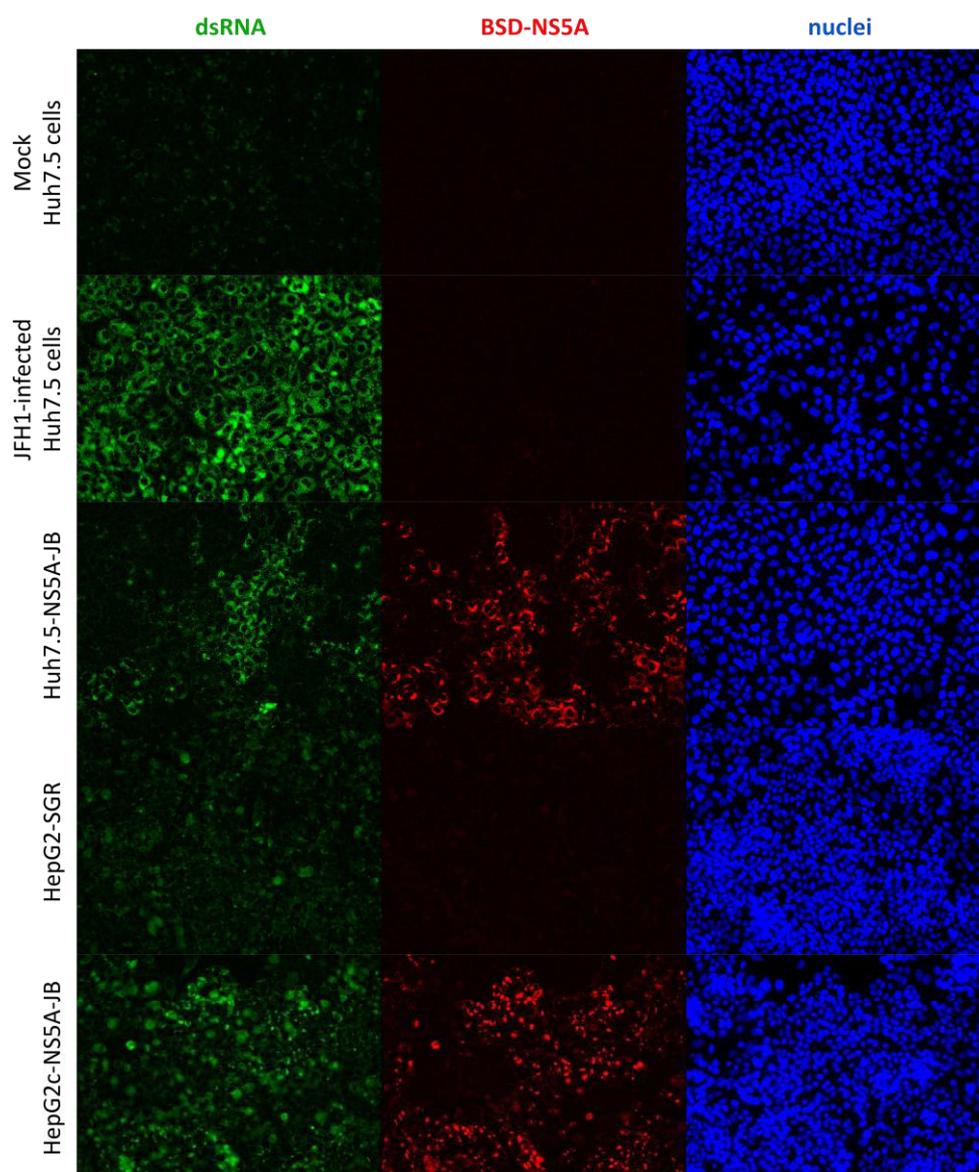
**Fig. 3.** Replication of JB virus in HepG2c cell lines. Control Huh7.5 and HepG2 cells, HepG2-SGR cells or JB-replicating Huh7.5 and HepG2c cell lines trans-complemented or not with V5-tagged NS5A were treated (\*) or not for 3 days with DMSO. RNA and proteins were extracted as described in material & methods section. (A) HCV (+)RNA was detected by Northern blotting with a full-length genomic (-)RNA probe. 30  $\mu\text{g}$  and 5  $\mu\text{g}$  total cellular RNAs were loaded for HepG2c and Huh7.5-NS5A-JB cell lines, respectively. (B) HCV RNA was quantified by one-step quantitative RT-PCR. Results were normalized with total RNA ( $\mu\text{g}$ ). (C) Structural proteins (E2, core) and non-structural proteins (NS3, BSD-tagged NS5A), as well as V5-tagged NS5A used for trans-complementation, were detected by immunoblotting with specific antibodies. 100  $\mu\text{g}$  and 70  $\mu\text{g}$  total cellular proteins were loaded for HepG2c-derived and Huh7.5-derived cell lines, respectively. Actin immunoblotting was performed to check for equal loadings.

Interestingly, we observed by immunofluorescence expected protein localization in both Huh7.5-NS5A-JB and HepG2c-NS5A-JB cell lines. Indeed, HCV core protein was localized at the periphery of lipid droplets (LD) and co-localized with BSD-tagged NS5A protein in both cell types (Fig. 4A, B). Moreover, HCV E2 glycoprotein showed a reticular localization pattern, and HCV double-stranded RNA (J2 antibody stain) co-localized partially with BSD-tagged NS5A and LD (Fig. 4A, B). Together, these observations suggest an efficient HCV replication in JB-replicating cells lines with a functional interaction between dsRNA, core and NS5A proteins that could lead to infectious viral production.



**Fig. 4.** Subcellular localization of viral components in JB-replicating hepatoma cell lines. (A) Huh7.5-NS5A-JB and (B) HepG2c-NS5A-JB cells were treated for 3 days with DMSO, fixed and stained for HCV core protein (core, red), gpE2 protein (E2, green), BSD-tagged NS5A protein (BSD, green), V5-tagged NS5A protein used for trans-complementation (V5, green) or double-stranded RNA (dsRNA, red), using specific antibodies. Lipid droplet (LD, blue) staining was performed in parallel to determine viral protein localization. Scale bar = 5  $\mu$ m. ND = not determined.

Surprisingly, the overall low protein expression levels observed in HepG2c-NS5A-JB cells by immunoblotting (Fig. 3C) were not only due to lower expression levels in each cell, but maybe also to more disparate protein expression levels from cell to cell. Indeed, we could detect gpE2 or core proteins by immunofluorescence in about 25 % of cells in HepG2c-NS5A-JB cells, whereas we could detect them in more than 50 % of cells in Huh7.5-NS5A-JB cells (Suppl. Fig. 2). The fact that not all cells are positive for gpE2 and core protein contrasts with their resistance to blasticidin at very high doses (up to 40  $\mu$ g/mL). Importantly, most of HepG2c-NS5A-JB cells replicated HCV RNA and expressed BSD-tagged NS5A protein, as seen by immunofluorescence (Suppl. Fig. 3), thus suggesting that only structural proteins were concerned by suboptimal detection by IF staining.



**Suppl. Fig. 3.** JB-replicating cells are positive for dsRNA and BSD-NS5A. Naïve Huh7.5 cells were infected (positive control) or not (negative control) with JFH1 at a MOI of 0.1, fixed and processed for IF staining after one week. Huh7.5-NS5A-JB, HepG2-SGR and HepG2c-NS5A-JB cells were incubated 3 days in DMSO-containing medium after confluence, fixed and processed for IF staining. Cells were fixed with 4 % PFA and permeabilized with saponin, then stained for viral RNA and BSD-NS5A with mouse monoclonal antibodies directed against dsRNA (clone J2) and BSD, respectively. Nuclei were counterstained with Hoechst. Pictures were acquired with the same camera parameters for each cell type and processed on ImageJ software with the same parameters to subtract background and enhance contrast.

### ***HCV replication induces ultrastructural alterations in Huh7.5 but not in HepG2 cells***

Several viruses including HCV have been described to use intracellular membranes for their replication and thus to modify subcellular ultrastructures by altering membrane conformations (60). In particular, HCV was shown to induce the formation of a so-called "membranous web" where RNA replication could occur (21, 29, 63). More recent studies showed that HCV replication in Huh7 or

Huh7.5 cells, bearing full-length or subgenomic replicon, respectively, induced an association between ER-derived membranes and LD (62), as well as an accumulation of double-membrane vesicles (DMV) which were typical autophagic structures (24, 74). Viral replication also triggers increased autophagy as well as mitochondrial injury, mainly via non-structural proteins (1, 13, 86). However, these experiments were mainly performed with subgenomic or full-length replicon bearing cells, in proliferative hepatoma cells, leading to high expression levels of viral proteins. In this context, we wanted to determine whether chronic HCV replication in partially re-differentiated hepatocytes could trigger the same ultrastructural modifications as previously described in proliferative replicon-bearing cells.

**Table 2.** Quantification of viro-induced ultrastructural modifications in Huh7.5 and HepG2 cell lines

Cell line	Day	Virus	LD <sup>a</sup>	LD size <sup>b</sup>	Clustered LD <sup>c</sup>	DMV <sup>d</sup>	ER – LD <sup>e</sup>	Dilated ER <sup>f</sup>	Autophagy <sup>g</sup>
Huh7.5 <sup>h</sup>	6	Mock	6.26	0.50	22 <sup>***</sup>	0.03 <sup>†</sup>	28	1.8	1.3 <sup>***</sup>
		JFH1-CSK	8.77	0.59	55 <sup>***</sup>	0.19 <sup>†</sup>	35	1.8	7.0 <sup>***</sup>
	10	Mock	5.16 <sup>*</sup>	0.50 <sup>†</sup>	27 <sup>†</sup>	0.00 <sup>*</sup>	42	2.2 <sup>†</sup>	1.8 <sup>**</sup>
		JFH1-CSK	6.20 <sup>*</sup>	0.61 <sup>†</sup>	46 <sup>†</sup>	0.23 <sup>*</sup>	39	1.7 <sup>†</sup>	9.1 <sup>**</sup>
Huh7.5	Chronic	JB <sup>i</sup>	8.61 <sup>*</sup>	0.44 <sup>†</sup>	71 <sup>**</sup>	0.70 <sup>***</sup>	67 <sup>*</sup>	1.9	11.5 <sup>***</sup>
HepG2c-NS5A	Chronic	Mock <sup>j</sup>	19.9 <sup>†</sup>	0.4 <sup>†</sup>	71.0	0.0	11.0 <sup>*</sup>	1.0	2.3 <sup>*</sup>
HepG2	Chronic	SGR <sup>j</sup>	19.1	0.5 <sup>†</sup>	72.0	0.0	21.0 <sup>*</sup>	1.0	0.6 <sup>*</sup>
HepG2c-NS5A	Chronic	JB <sup>j</sup>	11.1 <sup>†</sup>	0.4	54.0	0.0	18.0	1.0	1.7

<sup>a</sup> LD number for 100 μm<sup>2</sup> of cytoplasm

<sup>b</sup> Mean LD apparent diameter (μm)

<sup>c</sup> Percentage of LD found in clusters (more than 2 LD clustered)

<sup>d</sup> Double membrane vesicles: presence (1) or absence (0) in the vicinity of LD

<sup>e</sup> Percentage of LD surrounded by endoplasmic reticulum membranes

<sup>f</sup> Dilatation of endoplasmic reticulum: no (1), faint (2) or massive (3) dilatation

<sup>g</sup> Percentage of cytoplasm surface showing autophagic structures

<sup>h</sup> Statistical analysis: Wilcoxon non-parametric test (N=30)

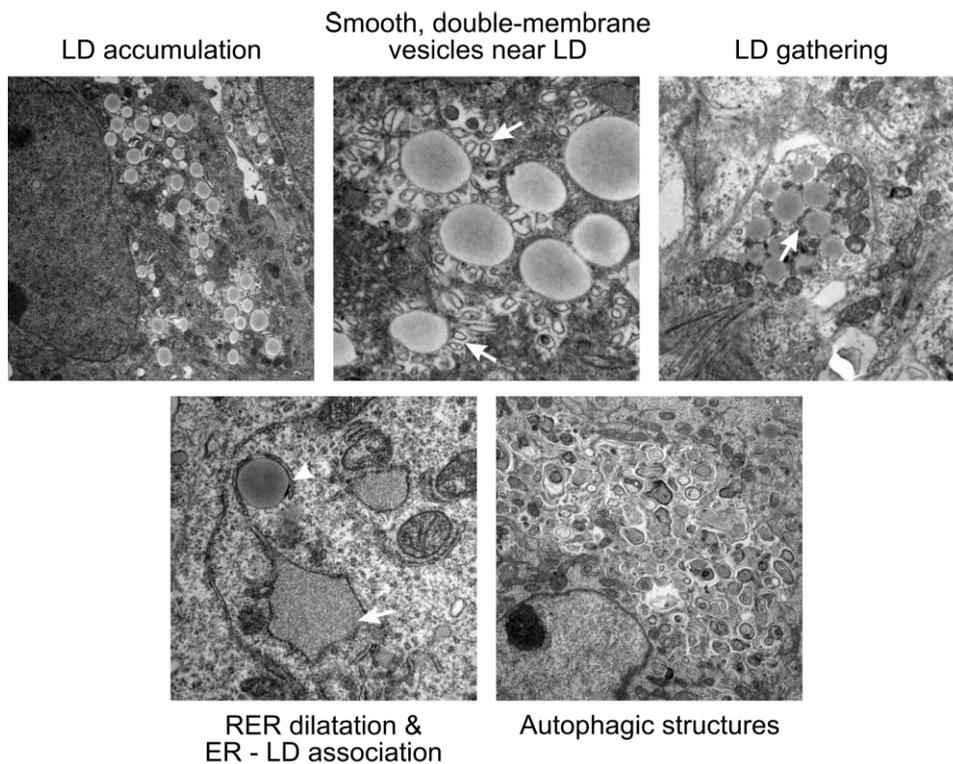
<sup>i</sup> Statistical analysis: Wilcoxon non-parametric test (N=10), compared to day 10 mock Huh7.5 cells

<sup>j</sup> Statistical analysis: Wilcoxon non-parametric test (N=10), compared to mock HepG2-NS5A cells

<sup>†</sup> p ≤ 0.1      \* p ≤ 0.05      \*\* p ≤ 0.01      \*\*\* p ≤ 0.001

Briefly, we treated naïve Huh7.5 cells with DMSO to re-differentiate them partially and infected them with HCV JFH1 viral strain. Viro-induced ultrastructural modifications were then observed by transmission electron microscopy 6 and 10 days after infection. Ultrastructural modifications were quantified by counting LD number, size and distribution, their association to double membrane vesicles (DMV) and to endoplasmic reticulum membranes (ER), but also by evaluating ER dilatation and autophagy abundance (exemplifying images of these structures are shown in Suppl. Fig. 4). Results presented in Table 2 showed a significant increase in LD number, clustering and association to DMV. However, no preferential association between LD and ER was observed in infected cells. Autophagy was also drastically increased in HCV-replicating cells. To better understand whether these modifications could be observed in chronic HCV-replicating cells, we used our JB-replicating Huh7.5 cell line. As for JFH1-infected cells, Huh7.5-JB cells showed increased autophagy, LD accumulation and gathering in peculiar structures containing DMV, but also an

increased association between ER-derived membranes and LD (Table 2). As HCV protein expression levels were lower in HepG2c-JB cell lines (Fig. 3C, Suppl. Fig. 2), we analyzed ultrastructural alterations in this model. Even if the vast majority of HepG2-SGR or HepG2c-NS5A-JB cells were positive for double-stranded RNA and thus HCV RNA replication (Suppl. Fig. 3), none of the previously described ultrastructural modifications have been observed (Table 2). The lower HCV RNA replication and protein expression observed in HepG2 cells may decrease HCV-induced ultrastructural changes. HepG2 could also react differently to HCV infection, leading to a less cytotoxic phenotype.



**Suppl. Fig. 4.** Exemplifying images of structures quantified by electron microscopy.

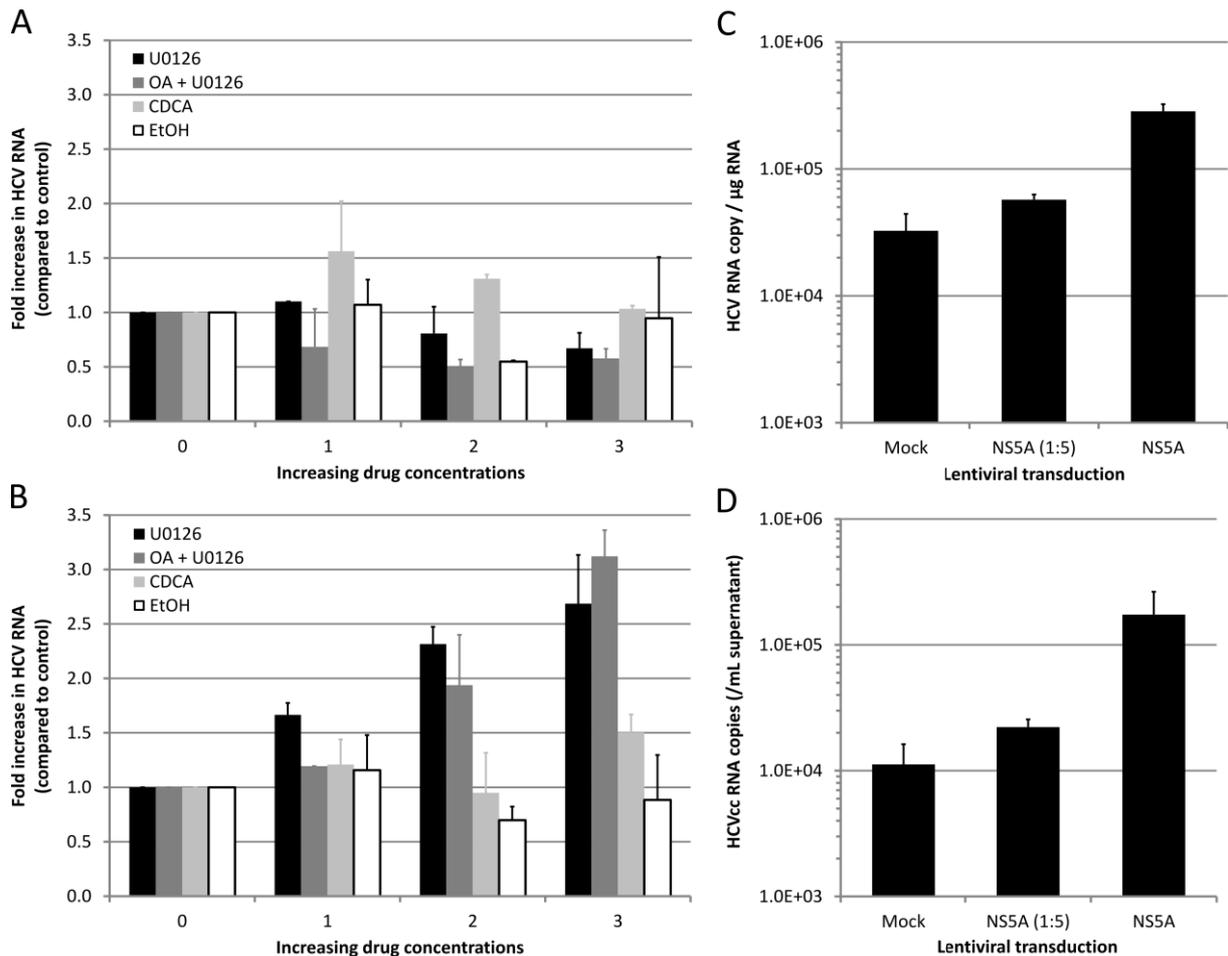
### ***MEK/ERK inhibition and NS5A trans-complementation enhances HCV RNA replication in HepG2c-JB cells***

Several drugs have been previously described to enhance HCV replication *in vitro*. For instance, ethanol, chenodeoxycholic acid (CDCA, a bile acid), and MEK/ERK inhibitor U0126 were shown to increase HCV replication in HCV subgenomic replicon cell lines (12, 93) and in JFH1-infected cells (67), respectively. Therefore, we tested each of these drugs on Huh7.5-NS5A-JB and HepG2c-NS5A-JB cells, in order to improve HCV replication in these cells. Neither alcohol nor CDCA or MEK/ERK inhibition had a significant effect on HCV RNA replication in Huh7.5-NS5A-JB cells (Fig. 5A). In contrast, viral RNA replication was increased upon MEK/ERK inhibition in HepG2c-NS5A-JB cells, with or without oleic acid treatment (Fig. 5B). No effect of either ethanol or bile acids was also detected in HepG2c-NS5A-JB cells. Interestingly, the best conditions to produce VLDL in HepG2 cells (Fig. 1) were also the best conditions to increase HCV replication, using OA stimulation and MEK/ERK inhibition.

To further improve viral replication in HepG2 cells, we investigated the effects of NS5A trans-complementation in HepG2c-JB cells. Transient or stable NS5A trans-complementation using lentiviral transduction in HepG2c-JB cells led up to 10-fold increase in intracellular viral RNA levels

(Fig. 3B, 5C), suggesting a partial deficiency of BSD-tagged NS5A protein regarding viral RNA replication. Transient viral replication trans-complementation with NS5A translated into increased viral RNA secretion in NS5A-overexpressing cells (Fig. 5D).

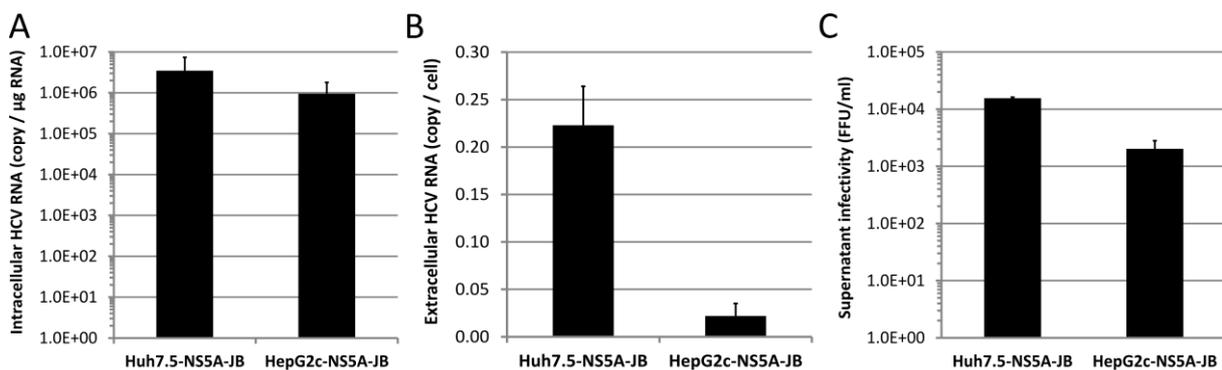
Finally, HCV replication in HepG2c-JB cells could be potentiated by OA/U0126 treatment, together with NS5A trans-complementation. Therefore, we used HepG2c-NS5A-JB cells, treated with DMSO, OA and U0126, to analyze viral particle secretion and association with lipoproteins in a HCV-replicating and VLDL-competent cell culture system.



**Fig. 5.** Modulation of HCV RNA replication in JB-replicating hepatoma cell lines. (A) Huh7.5-NS5A-JB or (B) HepG2c-NS5A-JB cells were treated with increasing concentrations of drugs for 24h and HCV RNA replication was assessed by one-step quantitative RT-PCR on cellular RNAs. Results were normalized with total RNA concentration and GUS gene expression. Data was presented as fold increase compared to untreated cells. Ethanol (EtOH): 0, 0.5, 1 and 2 %; chenodeoxycholic acid (CDCA): 0, 25, 50 and 100 mM; U0126: 0, 2.5, 5 and 10  $\mu\text{M}$ ; oleic acid (OA): 10 %. (C) HepG2c-JB cells were trans-complemented with NS5A using a lentiviral vector. 6 days after lentiviral transduction, intracellular HCV RNA was quantified by quantitative RT-PCR in trans-complemented and in control cells. (D) In the same time, extracellular HCV RNA was also quantified by quantitative RT-PCR.

### ***HepG2c-NS5A-JB cells secrete infectious viral particles***

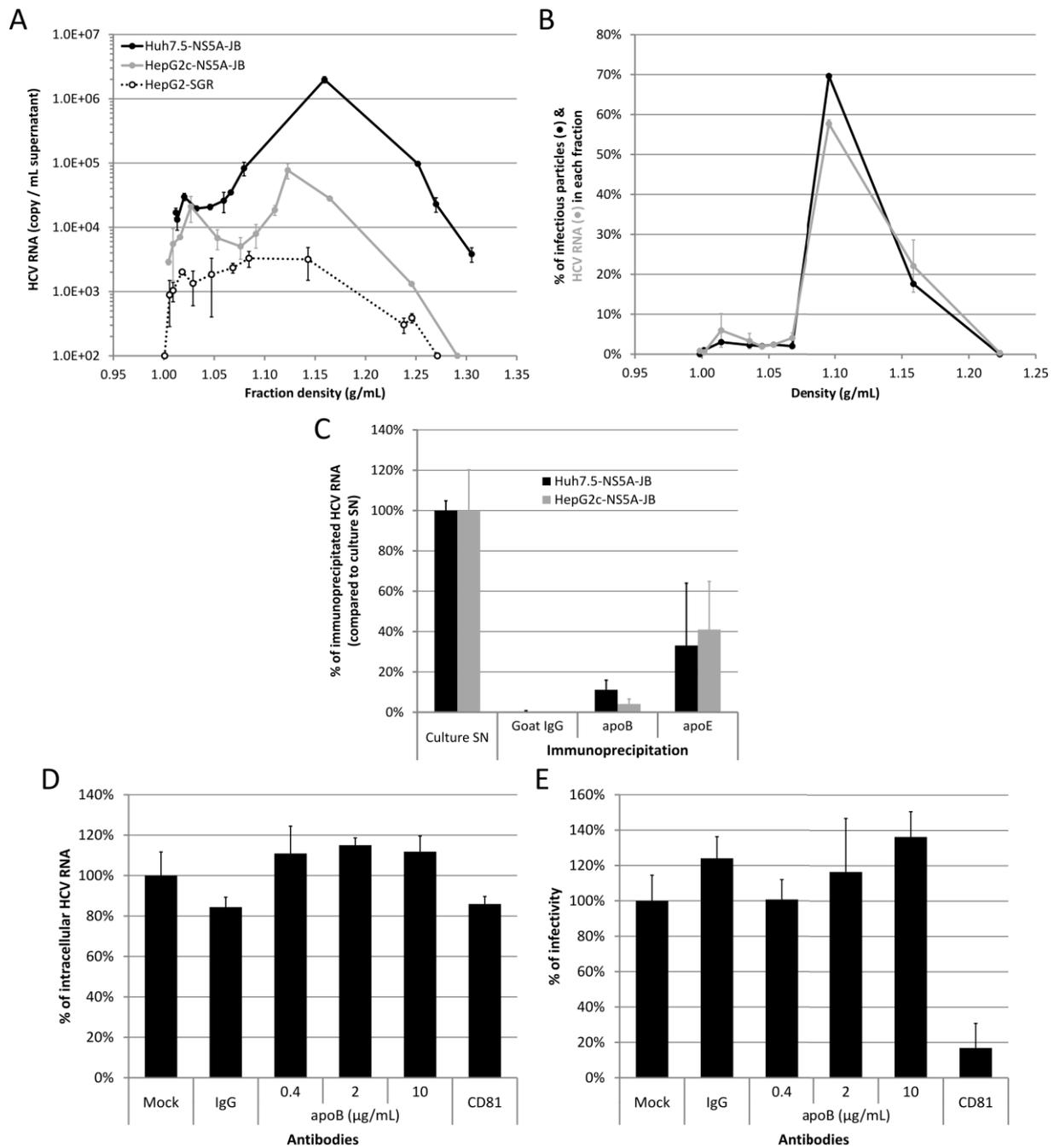
With optimized culture conditions, we could observe a 2 to 4 fold difference in intracellular HCV RNA levels between Huh7.5-NS5A-JB and HepG2c-NS5A-JB cell lines (Fig. 6A). Despite this rather weak difference, we found that HepG2c-NS5A-JB cells secreted 10 times less HCV RNA compared to Huh7.5-NS5A-JB cells (Fig. 6B), thus suggesting a lower efficiency of RNA secretion by HepG2c-NS5A-JB cells. In line with the latter result, Huh7.5-NS5A-JB and HepG2c-NS5A-JB cells were able to secrete infectious viral particles with titers of  $10^4$  and  $10^3$  focus forming units (FFU) per mL, respectively (Fig. 6C). The specific infectivity of virions produced by both cell type was not significantly different. Both cell lines have been therefore used to study viral particle secretion *in vitro*.



**Fig. 6.** JB-replicating hepatoma cell lines produce infectious viral particles. Huh7.5-NS5A-JB and HepG2c-NS5A-JB cells were treated for 3 days with DMSO and incubated another 24h with DMSO, OA and U0126 to harvest culture supernatants, or quantify intracellular viral RNA. (A) Intracellular HCV RNA was quantified by quantitative RT-PCR and results were normalized for total intracellular RNAs and GUS gene expression. (B) Extracellular HCV RNA was quantified by quantitative RT-PCR and results were normalized for cell number. (C) Supernatant infectivity was measured as focus-forming units (FFU/mL). Results were the means of 3 independent experiments.

### ***Huh7.5-NS5A-JB and HepG2c-NS5A-JB cells secrete similar apoE-positive/apoB-negative viral particles***

In order to characterize viral particle secretion by JB-replicating hepatoma cells, we harvested culture supernatants in optimal conditions for VLDL secretion, i.e. 3-day partial re-differentiation with 2 % DMSO, followed by 24 h with DMSO, OA and U0126. We investigated viral particle density by loading culture supernatants over iodixanol-sucrose gradients. A larger amount of HCV RNA was secreted by JB-replicating cells, compared to control HepG2-SGR cells, which argues for an effective viral particle release in these cells. Furthermore, the vast majority of HCV RNA peaked at high densities, between 1.1 and 1.2 g/mL, in both Huh7.5-NS5A-JB and HepG2c-NS5A-JB cell lines (Fig. 7A). A small amount of HCV RNA was found in intermediate- to low-density fractions (1.006-1.019 g/mL and 1.019-1.063 g/mL, respectively), and only 1 % in very-low-density fractions ( $d < 1.006$  g/mL). To further characterize viral production, we analyzed the density of infectious particles released from HepG2c-NS5A-JB cells. Interestingly, HepG2c-NS5A-JB cells secreted most of infectious particles in high-density fractions, similar to what was observed for HCV RNA secretion (Fig. 7B). More surprisingly, we did not detect infectious particles in the very-low-density fractions, even in HepG2c-NS5A-JB cell viral supernatants.

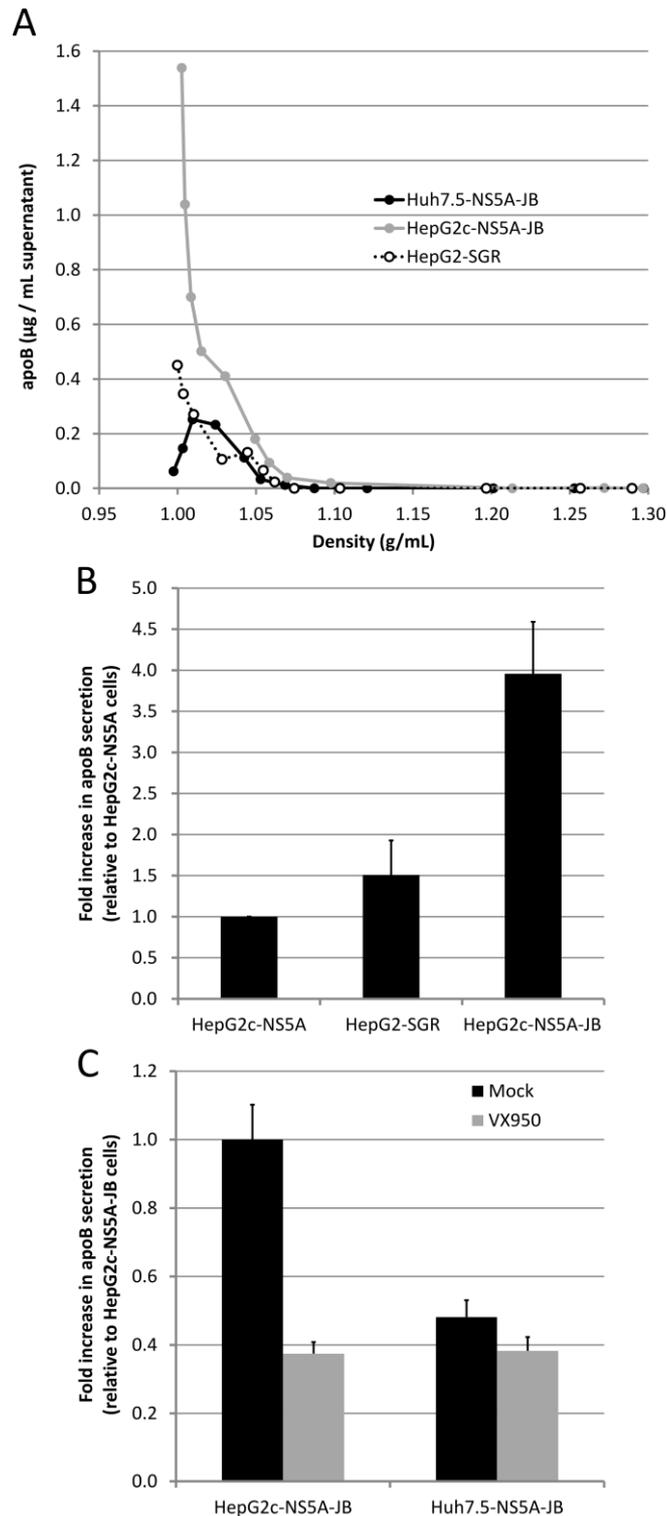


**Fig. 7.** Characterization of viral particles produced by JB-replicating cells. Huh7.5-NS5A-JB, HepG2-SGR and HepG2c-NS5A-JB cells were treated for 3 days after confluence with 2 % DMSO and incubated another 24h with serum-free medium containing 2 % DMSO, 10 % OA-BSA and 1  $\mu$ M U0126. Supernatants were harvested, 0.45  $\mu$ m filtered, concentrated and subjected to density separation on iodixanol-sucrose gradients, or used for immunoprecipitation (IP) and neutralization experiments. (A) HCV RNA concentration in each fraction was determined by quantitative RT-PCR (RTqPCR). Results are representative of 3 independent experiments. (B) HCV RNA and infectious viral particles secreted by HepG2c-NS5A-JB cells are shown in each fraction, as a % compared to the total amount of HCV RNA or infectious viral particles in the whole gradient. HCV RNA amount was determined by RTqPCR. Infectious viral particles were quantified using TCID<sub>50</sub> method. Results are representative of 2 independent experiments. (C) Harvested supernatants from Huh7.5-NS5A-JB and HepG2c-NS5A-JB cells were immunoprecipitated with goat polyclonal anti-apoB or anti-apoE

antibodies, using protein G-coated magnetic beads. IgG from goat serum were used for control. The percentage of HCV IP was assessed by quantifying HCV RNA using RTqPCR in immunoprecipitated pellets, compared to HCV RNA in culture supernatant (SN). N = 2. (D) & (E) Supernatants from HepG2c-NS5A-JB cells were incubated for 2h at room temperature with different concentrations of mouse monoclonal anti-apoB antibody [4G3], with 10 µg/mL of mouse monoclonal anti-CD81 antibody [JS81] as a positive neutralization control, or with 10 µg/mL of IgG from mouse serum as a negative control. Naïve Huh7.5 cells were then incubated for 4h at 37°C with supernatant/Ab mixtures and further processed. Cells meant to CD81 neutralization experiments were incubated with 10 µg/mL of anti-CD81 antibody concomitantly. (D) Cells were washed 3 times with PBS, total cellular RNAs extracted and HCV RNA quantified by RTqPCR. (E) Cells were washed once with PBS, and stained after 3 days for HCV core protein to determine viral titer (FFU). Results are the mean of 2 independent experiments.

Then, we investigated viral RNA association with secreted lipoproteins using immunoprecipitation assays followed by quantitative RT-PCR readout (IP/RTqPCR). Viral supernatants were immunoprecipitated with either anti-apoB or anti-apoE antibodies, using total IgG as a negative control. Most apoB100 was immunoprecipitated by anti-apoB antibodies as apoB100 was no more detected by immunoblotting in the flow-through fraction (Suppl. Fig. 5). Viral RNA was mainly associated with apoE (up to 50 %), but not or weakly with apoB (less than 10 %) (Fig. 7C). Surprisingly, no significant difference could be observed between both Huh7.5 and HepG2 cell types, although the latter are capable to secrete VLDL. This suggests that the association of HCV with apoB is not increased in VLDL-producing cells.

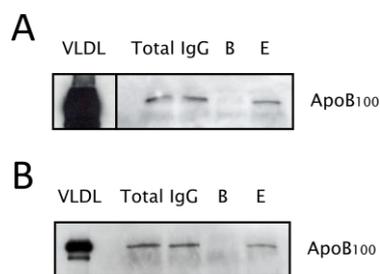
To better characterize the apparent lack of association of HepG2-produced HCVcc with apoB and to determine whether, despite an undetectable (or weak) association, apoB could have any biological significance regarding HCVcc entry properties, neutralization assays were performed. Culture supernatants from HepG2c-NS5A-JB cells were harvested as previously described, in serum-free medium, and incubated with mouse monoclonal anti-apoB antibody [4G3], an antibody which has been previously described to neutralize apoB interaction with the LDL receptor (61). Neutralizing mouse monoclonal anti-CD81 antibody [JS81] (41) was used as a technical control. Neutralization was performed in serum-free medium and two different read-outs were used, i.e. cell-associated HCV RNA after 4-hour of inoculation determined by quantitative RT-PCR (Fig. 7D), or quantification of productive entry events and subsequent replication assessed by focus-forming units titration (Fig. 7E). As expected, anti-CD81 antibodies were unable to decrease virus binding to cells after 4h of inoculation, but were able to efficiently neutralize entry and subsequent replication as shown by a 80 % reduction in the infectivity of HepG2c-NS5A-JB-produced viral particles in Huh7.5 cells (Fig. 7E). Importantly, none of the two read-outs showed a significant neutralization by neutralizing anti-apoB antibodies of either viral binding or entry/replication of HepG2c-NS5A-JB-produced viral particles in Huh7.5 cells (Fig. 7D, E). These results demonstrate that the very weak, likely not significant, apoB association with HCV particles in HepG2c-NS5A-JB cells is not linked to an increased viral particle infectivity *in vitro*.



**Fig. 8.** VLDL/apoB secretion in JB-replicating cell lines. (A) & (B) Huh7.5-NS5A-JB, HepG2-SGR, HepG2c and HepG2c-NS5A-JB cells were treated for 3 days after confluence with 2 % DMSO and incubated another 24h with serum-free medium containing 2 % DMSO, 10 % OA-BSA and 1  $\mu$ M U0126. Supernatants were harvested, 0.45  $\mu$ m filtered, concentrated and subjected to density separation on iodixanol-sucrose gradients. (A) ApoB concentration was determined in each fraction with a commercial ELISA kit and plotted against density. Results are representative of 3 independent experiments. (B) ApoB concentration was also determined in culture supernatants of HepG2-derived cells. Results are the mean of 4 independent experiments. (C) Huh7.5-NS5A-JB and HepG2c-NS5A-JB

cells were treated for 3 days after confluence with 2 % DMSO and 5  $\mu$ M VX-950, and incubated another 24h with serum-free medium containing 2 % DMSO, 10 % OA-BSA, 1  $\mu$ M U0126 and 5  $\mu$ M VX-950. ApoB concentration was determined in supernatants by ELISA.

Next, we analyzed apoB secretion profiles in our JB-replicating cell lines to test whether HCV replicating-HepG2 cells could have impaired ability to produce VLDL. As previously, we harvested culture supernatants after a 3-day treatment with DMSO and another 24h with DMSO, OA and U0126, then loaded harvested supernatants on iodixanol-sucrose density gradients and detected apoB in each fraction of the gradients by ELISA. Both HepG2-SGR and HepG2c-NS5A-JB cells secreted apoB in VLDL density range (Fig. 8A), as previously shown for non-infected HepG2-CD81 cells (Fig. 1A), thus showing that HCV does not seem to qualitatively modify VLDL secretion. Expectedly, Huh7.5-NS5A-JB cells secreted mainly intermediate- but not very-low-density apoB (Fig. 8A), confirming their defects regarding VLDL secretion as shown for naïve Huh7.5 cells. It is worth noting that HepG2c-NS5A-JB cells secreted more apoB than HepG2-SGR and HepG2c counterparts (Fig. 8B), thus suggesting that full length HCV replication and structural protein expression, including core protein expression, may potentiate apoB secretion *in vitro*, and not restrict it as suggested *in vivo* by the hypobetalipoproteinemia status of some patients (75, 83). To confirm that this observation was due to viral replication itself and not to cell line selection issues, we inhibited viral replication in Huh7.5-NS5A-JB and HepG2c-NS5A-JB cells with VX-950 compound (Telaprevir), a potent viral protease inhibitor. VX-950-treated cells showed a strong decrease in viral replication after 4 days (data not shown). Interestingly, treated HepG2c-NS5A-JB cells also showed a strong decrease in apoB secretion (Fig. 8C), thus confirming the role of HCV replication on increased apoB secretion in HepG2c-NS5A-JB cells. Moreover, no significant effect of VX-950 treatment was observed in Huh7.5-NS5A-JB cells pointing out once more functional differences between Huh7.5 and HepG2 cells regarding HCV biology and the relevance of HepG2-derived HCV-replicating systems.



**Suppl. Fig. 5.** Immunoprecipitation of apoB100 with anti-apoB antibodies. (A) HepG2-CD81 and Huh7.5 cells were treated for 3 days after confluence with 2 % DMSO and incubated another 24h with serum-free medium containing 2 % DMSO, 10 % OA-BSA and 1  $\mu$ M U0126. Supernatants were harvested, 0.45  $\mu$ m filtered and immunoprecipitated (IP) with goat polyclonal anti-apoB antibodies using protein G-coated magnetic beads. ApoB100 was detected in total supernatants and IP flow-through by immunoblotting. VLDL = control VLDL from human serum.

## Discussion

The main objective of this work was to develop a new cell culture model for HCV replication and production in cells that are also competent for the biogenesis of VLDL. We have chosen HepG2 cells for this purpose as we (Fig. 1), and others (57, 88), have shown that HepG2, in contrast to Huh7 (and derived) cells are capable to secrete VLDL, defined as apoB and apoE positive lipoprotein with a very-low-density ( $d < 1.006$  g/mL).

If Huh7 and derived cells are fully permissive to HCV infection, leading to high viral replication and production of progeny virions compatible with classical virological approaches, the permissivity of other hepatoma cell lines to HCV infection is lower and does not enable the persistent replication of the virus. High permissivity of Huh7.5 cell line has been partially attributed to the impairment of innate immune responses in these cells, especially via RIG-I (retinoic acid inducible gene I) mutation and inactivation (59, 85). In contrast to Huh7.5 cells, HepG2 cells support an antiviral innate immune response after HCV infection with type-I interferon secretion (data not shown). Sainz and collaborators recently suggested that the poor permissivity of several hepatoma cell lines could be partially attributed to HCV-induced innate signaling (79). Moreover, the high permissivity of Huh7 (and derived) cell line has also been partially attributed to the high expression levels of a liver-specific micro-RNA necessary for HCV RNA translation, miR-122 (32). Hence, the over-expression of miR-122 in otherwise negative HepG2 cells (66) or Hep3B cells (38) increased their permissivity to HCV infection. Moreover, ectopic expression of human miR-122 in mouse embryo fibroblasts (MEF) rendered them permissive to HCV RNA replication when combined to inhibition of IFN response (45), arguing for a critical role of miR-122 in determining viral tropism. Importantly, it has been shown that cells harboring HCV subgenomic replicons (and cells subsequently cured from those replicons) are positive for miR-122, arguing for a selection of a miR-122 phenotype during the establishment of the line (38). In this study, we have shown that cured HepG2 cells (HepG2c), deriving from HepG2-SGR cells (18) treated with IFN and anti-HCV-polymerase, together with an impaired IFN response, obtained by overexpression of IRF3( $\Delta$ N), was requested to efficiently generate a stably HCV-replicating HepG2 cell line (Table 1). To select for cells persistently replicating HCV over passages, we have opted for the use of a blasticidin(BSD)-tagged JFH1 strain (i.e. JFH1-BSD or to simplify JB), and as the BSD tag was inserted into the NS5A area, a trans-complementation with a V5-tagged version of NS5A was also performed. *In fine*, a cell line called HepG2c-NS5A-JB was generated and further used to analyze the interaction of HCV with lipoproteins.

We demonstrated an efficient viral RNA replication and viral protein production in HepG2c-NS5A-JB cells (cell line number#2) (Fig. 3). Under blasticidin treatment those cells can be extensively passaged and therefore cultivated in the long term. However, we observed by immuno-fluorescence (IF) high cell-to-cell variations in terms of protein expression levels (Fig. 2C, Suppl. Fig. 2). Clusters of core- or E2-positive cells were often observed (data not shown) and suggested a role of cell micro-environment in determining viral protein expression levels. Similar patched protein expression profiles have been observed *in vivo* on liver sections (43) and support the physiological relevance of these observations. It is worth noting that classical IF detection may not be sensitive enough to detect viral proteins in every cell, but only in cells with high protein expression levels. This was confirmed by the detection of dsRNA in most of the cells (Suppl. Fig. 3), and by their resistance to blasticidin, acquired by NS5A-BSD expression and thus viral replication. Whereas structural proteins are not detected in all cells in both Huh7.5-NS5A-JB and HepG2c-NS5A-JB cells, we have, however

and importantly, shown that the subcellular localization of viral components involved in HCV assembly/morphogenesis (i.e. gpE2, Core, NS5A, dsRNA) was correct, i.e. surrounding lipid droplets in compartmentalized subcellular area, in both cells types (Fig.4).

It is important to investigate the effects of variable protein expression on viral replication and cell physiology. In this respect, we investigated viral-induced ultrastructural modifications in HCV-replicating HepG2 cells, harboring low protein expression levels. Indeed, most of previously published reports interested in HCV-induced ultrastructural alterations were obtained with replicon systems allowing high viral RNA replication together with high viral protein expression. In our study, we confirmed previously described ultrastructural modifications, including LD clustering, autophagic and DMV structures (Suppl. Fig. 4) with JFH1-infected or JB-replicating Huh7.5 cells, but not with JB-replicating HepG2 cells (Table 2). This suggests that either low HCV protein expression does not alter cell ultrastructure, or that HepG2 cells are less susceptible to viral-induced modifications. It is interesting to note that some ultrastructural modifications such as stressed ER and increased autophagy have been observed in patients (6, 77), however no direct link with HCV protein expression has been yet and definitely demonstrated. This result warrants further investigation to confirm whether viro-induced ultrastructural changes observed in highly expressing Huh7 cells are physiological features or experimental artifacts due to aphysiologic replication levels.

HepG2 cells are thought to be more mature hepatocytes than Huh7 cells. For instance, they can secrete VLDL (57) and are functionally polarized (89, 92). The polarization status of these cells has been shown to modify and to be modified by HCV infection (55, 56). Therefore, HepG2 might be a more relevant model than Huh7 to study HCV infection and its impact on cell physiology. The MEK/ERK signaling pathway, downstream of growth factor receptors, is implied in crucial cellular processes, including proliferation, differentiation, angiogenesis and survival. It is overactivated in many tumors and is thought to contribute to tumorigenesis (91). Interestingly, we showed an improvement in viral RNA replication after MEK/ERK inhibition in HepG2 cells whereas no effect was observed in Huh7.5 cells (Fig. 5). MEK/ERK inhibition was also responsible for an improvement in VLDL secretion by HepG2 cells, but not by Huh7.5 cells (Fig. 1). However, both effects might be non-related since VLDL secretion may be stimulated upon MEK/ERK inhibition by an increase in microsomal triglyceride transfer protein (MTP) and diacylglycerol acyltransferases (DGAT) expression (88), whereas HCV RNA translation could be improved by increased IRES-mediated translation (67). Nevertheless, hepatocyte differentiation status and mitogen activity, as shown by MEK/ERK pathway activity, may be of importance to study HCV replication and production *in vitro*.

In this study, we were mainly interested in characterizing HCV association with lipoproteins in HepG2 cells, which are competent for VLDL secretion upon MEK/ERK inhibition and oleate treatment (Fig. 1). Indeed, an interaction between HCV RNA, apoB, and apoE has been suggested *in vivo* by different groups (3, 70, 87). *In vitro* however, most reports suggest a strong association of HCV particles with apoE, but not or weakly with apoB (37, 58, 71), which seems conflicting when the hypothesis of association between HCV and VLDL is concerned, as VLDL are clearly both apoB and apoE positive. ApoE seems necessary to infectious viral particle assembly and production (12, 37) via an interaction with NS5A protein (10). ApoE is indeed a host factor embarked on viral particles (58, 71) and crucial for particle infectivity via its interaction with LDL receptor (LDLR) at the surface of hepatocytes (34, 49, 71). On the other hand, some contradictory studies suggested that apoB and MTP could be required for HCV secretion *in vitro* (27, 35, 65), even if no clear demonstration of the presence of apoB on viral particles was provided. Therefore, lipoprotein biogenesis, and more precisely VLDL

synthesis, seems to have important roles regarding HCV particle assembly, secretion and infectivity. If apoE is strongly associated with secreted viral particles in cell culture, data of strong and specific association of HCV with apoB remains absent. As our HepG2c-NS5A-JBcells were capable to produce significant amount of infectious particles, in fact only 10 times less than their Huh7.5 counterpart (Fig. 6), they could be used to investigate association with lipoproteins. In this report, we show that HepG2-produced HCV particles, as previously described Huh7.5-produced particles (2, 58, 71), are apoE-positive but apoB-negative (Fig.7C), and we show/confirm that HCVcc produced by both cell types are not neutralized by neutralizing anti-apoB antibodies (clone 4G3) (Fig.7D). Moreover there were no significant differences between HepG2- and Huh7.5-produced particles in terms of density repartition of secreted RNA, with notably no RNA and infectivity in the very-low-density range (Fig. 7A, 7B). Altogether, these results suggests that the ability of cells to produce VLDL do not change the ability of the virus to associate to apoB *in vitro*. There are two possible scenarios regarding the molecular mechanism underlying LVP formation *in vivo*. They could either derive from an intracellular fusion between nascent VLDL and viral precursors, or from a post-secretion fusion between VLDL/LDL and HCV virions. In this respect, apoE could play an important role in the fusion process due to its exchangeable properties (80). A study by Gastaminza and colleagues demonstrated that, in Huh7 cells, intracellular HCV virions are high density particles, whereas secreted ones are lighter, thus suggesting the acquisition of low-density features (e.g. apoE and triglycerides) during trafficking through the Golgi (28). The presence of apoE in Huh7-produced HCVcc has since been confirmed by many studies (2, 58, 71). Our results obtained in HepG2 cells, together with previously published studies in Huh7 cells, seem to indicate that *in vitro*-produced HCV particles are apoE positive but apoB negative, thus suggesting that either way the intracellular or post-secretion fusion of lipoproteins and viral precursors does not happen in hepatoma cells. Altogether these results warrant further study to properly demonstrate whether HCV does associate to apoB-positive lipoproteins in physiological conditions *in vivo* and how this association takes place. In this respect, *in vivo* data suggesting a strong association between apoB and HCV has been recently revisited. Scholtes and collaborators demonstrated that LVP could mainly be apoB/gpE1-gpE2 positive, but nucleocapsid-free particles (82). This new subclass of particles could then be defined as defective sub-viral particles. Such sub-viral particles containing only HCV glycoproteins and apoB had already been described *in vitro* in HepG2 or Caco-2 cell lines overexpressing gpE1 and gpE2 viral proteins (36).

Another important finding of our study in HCV-producing HepG2 cells is that viral replication in those cells seem to increase apoB secretion without changing its density repartition in gradient (Fig. 8). This effect was not observed in HCV-producing Huh7.5 cells, pointing out once again differences between both cell types. These results contrast with the hypobetalipoproteinemia observed in some patients (75, 83) and which is thought to be a consequence of virus replication. However its underlying mechanisms remain mostly unknown.

To conclude, we engineered a new HCV-replicating cell culture model in HepG2 cells using a blasticidin-tagged viral strain. A full replication cycle with infectious viral particle secretion could be obtained with these cells, which could be used as an alternative to traditional Huh7 and derived cell lines which present polarity and VLDL secretion defects. We showed that apoE but not apoB is associated to cell-culture-grown HCV using VLDL competent HepG2 cells, thus questioning the relevance of *in vivo* observations suggesting an association between HCV and apoB. Indeed, infectious HCV particles may harbor only apoE and not apoB. The differential loading of these

particles with neutral lipids during viral assembly could then induce the variations in particle lipidation and density we observe *in vivo* (23, 48). Finally, it would be of high interest to identify cellular factors involved in the regulation of viral particle density in response to dietary signals and to determine whether these density modulations could impact HCV pathogenesis and persistence *in vivo*.

### **Acknowledgments**

We would like to thank Dr. Takaji Wakita (National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan) for the gift of JFH1 strain and HepG2-SGR cells, Dr. Charles M. Rice (The Rockefeller University, NY, USA) for the gift of Huh7.5 cells, Dr. Johan Neyts (Rega Institute, Leuven, Belgium) for the gift of anti-HCV-polymerase compounds. We also thank Ms Clarisse Benoit for her helpful and efficient technical assistance. This work was supported by a grant from the French National Agency for Research against AIDS and viral hepatitis (ANRS; AO1-2008-CSS4) and by the INSERM core grant. BJ was recipient of a bursary from the French Ministry of Research and Higher Education and also from the “Association pour la Recherche sur le Cancer” (ARC).

## References

1. **Ait-Goughoulte M., T. Kanda, K. Meyer, J. S. Ryerse, R. B. Ray, and R. Ray.** 2008. Hepatitis C virus genotype 1a growth and induction of autophagy. *J Virol* **82**:2241–2249.
2. **Akazawa D., K. Morikawa, N. Omi, H. Takahashi, N. Nakamura, H. Mochizuki, T. Date, K. Ishii, T. Suzuki, and T. Wakita.** 2011. Production and characterization of HCV particles from serum-free culture. *Vaccine* **29**:4821–4828.
3. **André P., F. Komurian-Pradel, S. Deforges, M. Perret, J. L. Berland, M. Sodoyer, S. Pol, C. Bréchet, G. Paranhos-Baccalà, and V. Lotteau.** 2002. Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles. *J Virol* **76**:6919–6928.
4. **Appel N., M. Zayas, S. Miller, J. Krijnse-Locker, T. Schaller, P. Friebe, S. Kallis, U. Engel, and R. Bartenschlager.** 2008. Essential role of domain III of nonstructural protein 5A for hepatitis C virus infectious particle assembly. *PLoS Pathog* **4**:e1000035.
5. **Asselah T., L. Rubbia-Brandt, P. Marcellin, and F. Negro.** 2006. Steatosis in chronic hepatitis C: why does it really matter? *Gut* **55**:123–130.
6. **Asselah T., I. Bièche, A. Mansouri, I. Laurendeau, D. Cazals-Hatem, G. Feldmann, P. Bedossa, V. Paradis, M. Martinot-Peignoux, D. Lebrech, C. Guichard, E. Ogier-Denis, M. Vidaud, Z. Tellier, V. Soumelis, P. Marcellin, and R. Moreau.** 2010. In vivo hepatic endoplasmic reticulum stress in patients with chronic hepatitis C. *J Pathol* **221**:264–274.
7. **Bartenschlager R., F. Penin, V. Lohmann, and P. André.** 2011. Assembly of infectious hepatitis C virus particles. *Trends Microbiol* **19**:95–103.
8. **Bartosch B., and F.-L. Cosset.** 2009. Studying HCV cell entry with HCV pseudoparticles (HCVpp). *Methods Mol Biol* **510**:279–293.
9. **Bartosch B., A. Vitelli, C. Granier, C. Goujon, J. Dubuisson, S. Pascale, E. Scarselli, R. Cortese, A. Nicosia, and F.-L. Cosset.** 2003. Cell entry of hepatitis C virus requires a set of co-receptors that include the CD81 tetraspanin and the SR-B1 scavenger receptor. *J Biol Chem* **278**:41624–41630.
10. **Benga W. J. A., S. E. Krieger, M. Dimitrova, M. B. Zeisel, M. Parnot, J. Lupberger, E. Hildt, G. Luo, J. McLauchlan, T. F. Baumert, and C. Schuster.** 2010. Apolipoprotein E interacts with hepatitis C virus nonstructural protein 5A and determines assembly of infectious particles. *Hepatology* **51**:43–53.
11. **Blight K. J., J. A. McKeating, and C. M. Rice.** 2002. Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* **76**:13001–13014.
12. **Chang K.-S., J. Jiang, Z. Cai, and G. Luo.** 2007. Human apolipoprotein e is required for infectivity and production of hepatitis C virus in cell culture. *J Virol* **81**:13783–93.
13. **Chu V. C., S. Bhattacharya, A. Nomoto, J. Lin, S. K. Zaidi, T. D. Oberley, S. A. Weinman, S. Azhar, and T.-T. Huang.** 2011. Persistent expression of hepatitis C virus non-structural proteins leads to increased autophagy and mitochondrial injury in human hepatoma cells. *PLoS ONE* **6**:e28551.
14. **Corey K. E., E. Kane, C. Munroe, L. L. Barlow, H. Zheng, and R. T. Chung.** 2009. Hepatitis C virus infection and its clearance alter circulating lipids: implications for long-term follow-up. *Hepatology* **50**:1030–1037.
15. **Cun W., J. Jiang, and G. Luo.** 2010. The C-terminal alpha-helix domain of apolipoprotein E is required for interaction with nonstructural protein 5A and assembly of hepatitis C virus. *J Virol* **84**:11532–11541.
16. **Dai C.-Y., W.-L. Chuang, C.-K. Ho, M.-Y. Hsieh, J.-F. Huang, L.-P. Lee, N.-J. Hou, Z.-Y. Lin, S.-C. Chen, M.-Y. Hsieh, L.-Y. Wang, J.-F. Tsai, W.-Y. Chang, and M.-L. Yu.** 2008. Associations between hepatitis C viremia and low serum triglyceride and cholesterol levels: a community-based study. *J Hepatol* **49**:9–16.
17. **Dash S., A. B. Halim, H. Tsuji, N. Hiramatsu, and M. A. Gerber.** 1997. Transfection of HepG2 cells with infectious hepatitis C virus genome. *Am J Pathol* **151**:363–373.
18. **Date T., T. Kato, M. Miyamoto, Z. Zhao, K. Yasui, M. Mizokami, and T. Wakita.** 2004. Genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon can replicate in HepG2 and IMY-N9 cells. *J Biol Chem* **279**:22371–22376.
19. **Delgrange D., A. Pillez, S. Castelain, L. Cocquerel, Y. Rouillé, J. Dubuisson, T. Wakita, G. Duverlie, and C. Wychowski.** 2007. Robust production of infectious viral particles in Huh-7 cells by introducing mutations in hepatitis C virus structural proteins. *J Gen Virol* **88**:2495–503.

20. **Dixon J. L., and H. N. Ginsberg.** 1993. Regulation of hepatic secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins: information obtained from cultured liver cells. *J Lipid Res* **34**:167–179.
21. **Egger D., B. Wölk, R. Gosert, L. Bianchi, H. E. Blum, D. Moradpour, and K. Bienz.** 2002. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol* **76**:5974–5984.
22. **el-Awady M. K., A. A. Tabll, Y. S. el-Abd, M. M. Bahgat, H. A. Shoeb, S. S. Youssef, N. G. Bader el-Din, el-R. M. Redwan, M. el-Demellawy, M. H. Omran, W. T. el-Garf, and S. A. Goueli.** 2006. HepG2 cells support viral replication and gene expression of hepatitis C virus genotype 4 in vitro. *World J Gastroenterol* **12**:4836–4842.
23. **Felmlee D. J., D. A. Sheridan, S. H. Bridge, S. U. Nielsen, R. W. Milne, C. J. Packard, M. J. Caslake, J. McLauchlan, G. L. Toms, R. D. G. Neely, and M. F. Bassendine.** 2010. Intravascular transfer contributes to postprandial increase in numbers of very-low-density hepatitis C virus particles. *Gastroenterology* **139**:1774–1783, 1783.e1–6.
24. **Ferraris P., E. Blanchard, and P. Roingard.** 2010. Ultrastructural and biochemical analyses of hepatitis C virus-associated host cell membranes. *J Gen Virol* **91**:2230–2237.
25. **Fukuhara T., H. Tani, M. Shiokawa, Y. Goto, T. Abe, A. Taketomi, K. Shirabe, Y. Machara, and Y. Matsuura.** 2011. Intracellular delivery of serum-derived hepatitis C virus. *Microbes Infect* **13**:405–412.
26. **Galbraith R. A., S. Sassa, and H. Fujita.** 1988. Regulation of heme synthesis in HepG2 human hepatoma cells by dimethyl sulfoxide. *Biochem Biophys Res Commun* **153**:869–874.
27. **Gastaminza P., G. Cheng, S. Wieland, J. Zhong, W. Liao, and F. V. Chisari.** 2008. Cellular determinants of hepatitis C virus assembly, maturation, degradation, and secretion. *J Virol* **82**:2120–9.
28. **Gastaminza P., S. B. Kapadia, and F. V. Chisari.** 2006. Differential biophysical properties of infectious intracellular and secreted hepatitis C virus particles. *J Virol* **80**:11074–81.
29. **Gosert R., D. Egger, V. Lohmann, R. Bartenschlager, H. E. Blum, K. Bienz, and D. Moradpour.** 2003. Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons. *J Virol* **77**:5487–5492.
30. **Hadlock K. G., R. E. Lanford, S. Perkins, J. Rowe, Q. Yang, S. Levy, P. Pileri, S. Abrignani, and S. K. Fong.** 2000. Human monoclonal antibodies that inhibit binding of hepatitis C virus E2 protein to CD81 and recognize conserved conformational epitopes. *J Virol* **74**:10407–10416.
31. **Harris H. J., C. Davis, J. G. L. Mullins, K. Hu, M. Goodall, M. J. Farquhar, C. J. Mee, K. McCaffrey, S. Young, H. Drummer, P. Balfe, and J. A. McKeating.** 2010. Claudin association with CD81 defines hepatitis C virus entry. *J Biol Chem* **285**:21092–21102.
32. **Henke J. I., D. Goergen, J. Zheng, Y. Song, C. G. Schüttler, C. Fehr, C. Jünemann, and M. Niepmann.** 2008. microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *EMBO J* **27**:3300–3310.
33. **Herker E., and M. Ott.** 2011. Unique ties between hepatitis C virus replication and intracellular lipids. *Trends Endocrinol Metab* **22**:241–248.
34. **Hishiki T., Y. Shimizu, R. Tobita, K. Sugiyama, K. Ogawa, K. Funami, Y. Ohsaki, T. Fujimoto, H. Takaku, T. Wakita, T. F. Baumert, Y. Miyanari, and K. Shimotohno.** 2010. Infectivity of hepatitis C virus is influenced by association with apolipoprotein E isoforms. *J Virol* **84**:12048–12057.
35. **Huang H., F. Sun, D. M. Owen, W. Li, Y. Chen, M. Gale, and J. Ye.** 2007. Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:5848–53.
36. **Icard V., O. Diaz, C. Scholtes, L. Perrin-Cocon, C. Ramière, R. Bartenschlager, F. Penin, V. Lotteau, and P. André.** 2009. Secretion of hepatitis C virus envelope glycoproteins depends on assembly of apolipoprotein B positive lipoproteins. *PLoS ONE* **4**:e4233.
37. **Jiang J., and G. Luo.** 2009. Apolipoprotein E but not B is required for the formation of infectious hepatitis C virus particles. *J Virol* **83**:12680–12691.
38. **Kambara H., T. Fukuhara, M. Shiokawa, C. Ono, Y. Ohara, W. Kamitani, and Y. Matsuura.** 2012. Establishment of a Novel Permissive Cell Line for the Propagation of Hepatitis C Virus by Expression of MicroRNA miR122. *J Virol* **86**:1382–1393.
39. **Knobler H., T. Zhornicky, A. Sandler, N. Haran, Y. Ashur, and A. Schattner.** 2003. Tumor necrosis factor-alpha-induced insulin resistance may mediate the hepatitis C virus-diabetes association. *Am J Gastroenterol* **98**:2751–2756.

40. **Komurian-Pradel F., G. Paranhos-Baccalà, M. Sodoyer, P. Chevallier, B. Mandrand, V. Lotteau, and P. André.** 2001. Quantitation of HCV RNA using real-time PCR and fluorimetry. *J Virol Methods* **95**:111–119.
41. **Lavillette D., A. W. Tarr, C. Voisset, P. Donot, B. Bartosch, C. Bain, A. H. Patel, J. Dubuisson, J. K. Ball, and F.-L. Cosset.** 2005. Characterization of host-range and cell entry properties of the major genotypes and subtypes of hepatitis C virus. *Hepatology* **41**:265–274.
42. **Lerat H., H. L. Kammoun, I. Hainault, E. Mérour, M. R. Higgs, C. Callens, S. M. Lemon, F. Fougelle, and J.-M. Pawlotsky.** 2009. Hepatitis C virus proteins induce lipogenesis and defective triglyceride secretion in transgenic mice. *J Biol Chem* **284**:33466–33474.
43. **Liang Y., T. Shilagard, S.-Y. Xiao, N. Snyder, D. Lau, L. Cicalese, H. Weiss, G. Vargas, and S. M. Lemon.** 2009. Visualizing hepatitis C virus infections in human liver by two-photon microscopy. *Gastroenterology* **137**:1448–1458.
44. **Lim S. P., H. M. Soo, Y. H. Tan, S. Brenner, H. Horstmann, J. M. MacKenzie, M. L. Ng, S. G. Lim, and W. jin Hong.** 2002. Inducible system in human hepatoma cell lines for hepatitis C virus production. *Virology* **303**:79–99.
45. **Lin L.-T., R. S. Noyce, T. N. Q. Pham, J. A. Wilson, G. R. Sisson, T. I. Michalak, K. L. Mossman, and C. D. Richardson.** 2010. Replication of Subgenomic Hepatitis C Virus Replicons in Mouse Fibroblasts Is Facilitated by Deletion of Interferon Regulatory Factor 3 and Expression of Liver-Specific MicroRNA 122. *J Virol* **84**:9170–9180.
46. **Lin R., C. Heylbroeck, P. M. Pitha, and J. Hiscott.** 1998. Virus-dependent phosphorylation of the IRF-3 transcription factor regulates nuclear translocation, transactivation potential, and proteasome-mediated degradation. *Mol Cell Biol* **18**:2986–2996.
47. **Lindenbach B. D., M. J. Evans, A. J. Syder, B. Wölk, T. L. Tellinghuisen, C. C. Liu, T. Maruyama, R. O. Hynes, D. R. Burton, J. A. McKeating, and C. M. Rice.** 2005. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* **309**:623–626.
48. **Lindenbach B. D., P. Meuleman, A. Ploss, T. Vanwolleghem, A. J. Syder, J. A. McKeating, R. E. Lanford, S. M. Feinstone, M. E. Major, G. Leroux-Roels, and C. M. Rice.** 2006. Cell culture-grown hepatitis C virus is infectious in vivo and can be recultured in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:3805–3809.
49. **Liu S., K. D. McCormick, W. Zhao, T. Zhao, D. Fan, and T. Wang.** 2012. Human apolipoprotein E peptides inhibit hepatitis C virus entry by blocking virus binding. *Hepatology*. doi:10.1002/hep.25665
50. **Lucifora J., D. Durantel, B. Testoni, O. Hantz, M. Levrero, and F. Zoulim.** 2010. Control of hepatitis B virus replication by innate response of HepaRG cells. *Hepatology* **51**:63–72.
51. **Lupberger J., M. B. Zeisel, F. Xiao, C. Thumann, I. Fofana, L. Zona, C. Davis, C. J. Mee, M. Turek, S. Gorke, C. Royer, B. Fischer, M. N. Zahid, D. Lavillette, J. Fresquet, F.-L. Cosset, S. M. Rothenberg, T. Pietschmann, A. H. Patel, P. Pessaux, M. Doffoël, W. Raffelsberger, O. Poch, J. A. McKeating, L. Brino, and T. F. Baumert.** 2011. EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy. *Nat Med* **17**:589–595.
52. **Marion M.-J., O. Hantz, and D. Durantel.** 2010. The HepaRG cell line: biological properties and relevance as a tool for cell biology, drug metabolism, and virology studies. *Methods Mol Biol* **640**:261–272.
53. **Mason A. L., J. Y. Lau, N. Hoang, K. Qian, G. J. Alexander, L. Xu, L. Guo, S. Jacob, F. G. Regenstein, R. Zimmerman, J. E. Everhart, C. Wasserfall, N. K. Maclaren, and R. P. Perrillo.** 1999. Association of diabetes mellitus and chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* **29**:328–333.
54. **McCormick C. J., L. Challinor, A. Macdonald, D. J. Rowlands, and M. Harris.** 2004. Introduction of replication-competent hepatitis C virus transcripts using a tetracycline-regulable baculovirus delivery system. *J Gen Virol* **85**:429–439.
55. **Mee C. J., M. J. Farquhar, H. J. Harris, K. Hu, W. Ramma, A. Ahmed, P. Maurel, R. Bicknell, P. Balfe, and J. A. McKeating.** 2010. Hepatitis C virus infection reduces hepatocellular polarity in a vascular endothelial growth factor-dependent manner. *Gastroenterology* **138**:1134–1142.
56. **Mee C. J., H. J. Harris, M. J. Farquhar, G. Wilson, G. Reynolds, C. Davis, S. C. D. van IJzendoorn, P. Balfe, and J. A. McKeating.** 2009. Polarization restricts hepatitis C virus entry into HepG2 hepatoma cells. *J Virol* **83**:6211–6221.
57. **Meex S. J. R., U. Andreo, J. D. Sparks, and E. A. Fisher.** 2011. Huh-7 or HepG2 cells: which is the better model for studying human apolipoprotein-B100 assembly and secretion? *J Lipid Res* **52**:152–158.

58. **Merz A., G. Long, M.-S. Hiet, B. Brügger, P. Chlanda, P. Andre, F. Wieland, J. Krijnse-Locker, and R. Bartenschlager.** 2011. Biochemical and morphological properties of hepatitis C virus particles and determination of their lipidome. *J Biol Chem* **286**:3018–3032.
59. **Meylan E., J. Curran, K. Hofmann, D. Moradpour, M. Binder, R. Bartenschlager, and J. Tschopp.** 2005. Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* **437**:1167–1172.
60. **Miller S., and J. Krijnse-Locker.** 2008. Modification of intracellular membrane structures for virus replication. *Nat Rev Microbiol* **6**:363–374.
61. **Milne R. W., R. Theolis Jr, R. B. Verdery, and Y. L. Marcel.** 1983. Characterization of monoclonal antibodies against human low density lipoprotein. *Arteriosclerosis* **3**:23–30.
62. **Miyinari Y., K. Atsuzawa, N. Usuda, K. Watashi, T. Hishiki, M. Zayas, R. Bartenschlager, T. Wakita, M. Hijikata, and K. Shimotohno.** 2007. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol* **9**:1089–1097.
63. **Moradpour D., M. J. Evans, R. Gosert, Z. Yuan, H. E. Blum, S. P. Goff, B. D. Lindenbach, and C. M. Rice.** 2004. Insertion of green fluorescent protein into nonstructural protein 5A allows direct visualization of functional hepatitis C virus replication complexes. *J Virol* **78**:7400–9.
64. **Moucari R., T. Asselah, D. Cazals-Hatem, H. Voitot, N. Boyer, M.-P. Ripault, R. Sobesky, M. Martinot-Peignoux, S. Maylin, M.-H. Nicolas-Chanoine, V. Paradis, M. Vidaud, D. Valla, P. Bedossa, and P. Marcellin.** 2008. Insulin resistance in chronic hepatitis C: association with genotypes 1 and 4, serum HCV RNA level, and liver fibrosis. *Gastroenterology* **134**:416–423.
65. **Nahmias Y., J. Goldwasser, M. Casali, D. van Poll, T. Wakita, R. T. Chung, and M. L. Yarmush.** 2008. Apolipoprotein B-dependent hepatitis C virus secretion is inhibited by the grapefruit flavonoid naringenin. *Hepatology* **47**:1437–1445.
66. **Narbus C. M., B. Israelow, M. Sourisseau, M. L. Michta, S. E. Hopcraft, G. M. Zeiner, and M. J. Evans.** 2011. HepG2 cells expressing microRNA miR-122 support the entire hepatitis C virus life cycle. *J Virol* **85**:12087–12092.
67. **Ndjomou J., I.-W. Park, Y. Liu, L. D. Mayo, and J. J. He.** 2009. Up-Regulation of Hepatitis C Virus Replication and Production by Inhibition of MEK/ERK Signaling. *PLoS ONE* **4**:e7498.
68. **Negro F.** 2010. Abnormalities of lipid metabolism in hepatitis C virus infection. *Gut* **59**:1279–1287.
69. **Negro F., and A. J. Sanyal.** 2009. Hepatitis C virus, steatosis and lipid abnormalities: clinical and pathogenic data. *Liver Int* **29 Suppl 2**:26–37.
70. **Nielsen S. U., M. F. Bassendine, A. D. Burt, C. Martin, W. Pumeekochchai, and G. L. Toms.** 2006. Association between hepatitis C virus and very-low-density lipoprotein (VLDL)/LDL analyzed in iodixanol density gradients. *J Virol* **80**:2418–2428.
71. **Owen D. M., H. Huang, J. Ye, and M. Gale.** 2009. Apolipoprotein E on hepatitis C virion facilitates infection through interaction with low-density lipoprotein receptor. *Virology* **394**:99–108.
72. **Owsianka A., R. F. Clayton, L. D. Loomis-Price, J. A. McKeating, and A. H. Patel.** 2001. Functional analysis of hepatitis C virus E2 glycoproteins and virus-like particles reveals structural dissimilarities between different forms of E2. *J Gen Virol* **82**:1877–83.
73. **Parent R., M.-J. Marion, L. Furio, C. Trépo, and M.-A. Petit.** 2004. Origin and characterization of a human bipotent liver progenitor cell line. *Gastroenterology* **126**:1147–1156.
74. **Paul D., I. Romero-Brey, J. Gouttenoire, S. Stoitsova, J. Krijnse-Locker, D. Moradpour, and R. Bartenschlager.** 2011. NS4B self-interaction through conserved C-terminal elements is required for the establishment of functional hepatitis C virus replication complexes. *J Virol* **85**:6963–6976.
75. **Petit J. M., M. Benichou, L. Duvillard, V. Jooste, J. B. Bour, A. Minello, B. Verges, J. M. Brun, P. Gambert, and P. Hillon.** 2003. Hepatitis C virus-associated hypobetalipoproteinemia is correlated with plasma viral load, steatosis, and liver fibrosis. *Am. J. Gastroenterol.* **98**:1150–1154.
76. **Pietschmann T., A. Kaul, G. Koutsoudakis, A. Shavinskaya, S. Kallis, E. Steinmann, K. Abid, F. Negro, M. Dreux, F.-L. Cosset, and R. Bartenschlager.** 2006. Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:7408–7413.
77. **Rautou P.-E., D. Cazals-Hatem, G. Feldmann, A. Mansouri, A. Grodet, S. Barge, M. Martinot-Peignoux, A. Duces, I. Bièche, D. Lebrech, P. Bedossa, V. Paradis, P. Marcellin, D. Valla, T. Asselah, and R. Moreau.** 2011. Changes in autophagic response in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Am J Pathol* **178**:2708–2715.

78. **Sainz B., and F. V. Chisari.** 2006. Production of infectious hepatitis C virus by well-differentiated, growth-arrested human hepatoma-derived cells. *J Virol* **80**:10253–7.
79. **Sainz B. Jr, N. Barretto, X. Yu, P. Corcoran, and S. L. Uprichard.** 2012. Permissiveness of human hepatoma cell lines for HCV infection. *Virology* **9**:30.
80. **Saito H., P. Dhanasekaran, F. Baldwin, K. H. Weisgraber, S. Lund-Katz, and M. C. Phillips.** 2001. Lipid binding-induced conformational change in human apolipoprotein E. Evidence for two lipid-bound states on spherical particles. *J Biol Chem* **276**:40949–40954.
81. **Sambrook J., and D. W. Russell.** 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. CSHL Press.
82. **Scholtes C., C. Ramière, D. Rainteau, L. Perrin-Cocon, C. Wolf, L. Humbert, M. Carreras, A. Guironnet-Paquet, F. Zoulim, R. Bartenschlager, V. Lotteau, P. André, and O. Diaz.** 2012. High plasma level of nucleocapsid-free envelope glycoprotein-positive lipoproteins in hepatitis C patients. *Hepatology*. doi:10.1002/hep.25628
83. **Serfaty L., T. Andreani, P. Giral, N. Carbonell, O. Chazouillères, and R. Poupon.** 2001. Hepatitis C virus induced hypobetalipoproteinemia: a possible mechanism for steatosis in chronic hepatitis C. *J Hepatol* **34**:428–434.
84. **Serfaty L., and J. Capeau.** 2009. Hepatitis C, insulin resistance and diabetes: clinical and pathogenic data. *Liver Int* **29 Suppl 2**:13–25.
85. **Sumpter R. Jr, Y.-M. Loo, E. Foy, K. Li, M. Yoneyama, T. Fujita, S. M. Lemon, and M. Gale Jr.** 2005. Regulating intracellular antiviral defense and permissiveness to hepatitis C virus RNA replication through a cellular RNA helicase, RIG-I. *J Virol* **79**:2689–2699.
86. **Taguwa S., H. Kambara, N. Fujita, T. Noda, T. Yoshimori, K. Koike, K. Moriishi, and Y. Matsuura.** 2011. Dysfunction of autophagy participates in vacuole formation and cell death in cells replicating hepatitis C virus. *J Virol* **85**:13185–13194.
87. **Thomssen R., S. Bonk, C. Propfe, K. H. Heermann, H. G. Köchel, and A. Uy.** 1992. Association of hepatitis C virus in human sera with beta-lipoprotein. *Med Microbiol Immunol* **181**:293–300.
88. **Tsai J., W. Qiu, R. Kohen-Avramoglu, and K. Adeli.** 2007. MEK-ERK inhibition corrects the defect in VLDL assembly in HepG2 cells: potential role of ERK in VLDL-ApoB100 particle assembly. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**:211–218.
89. **van IJzendoorn S. C., and D. Hoekstra.** 2000. Polarized sphingolipid transport from the subapical compartment changes during cell polarity development. *Mol Biol Cell* **11**:1093–1101.
90. **Wakita T., T. Pietschmann, T. Kato, T. Date, M. Miyamoto, Z. Zhao, K. Murthy, A. Habermann, H.-G. Kräusslich, M. Mizokami, R. Bartenschlager, and T. J. Liang.** 2005. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* **11**:791–796.
91. **Whittaker S., R. Marais, and A. X. Zhu.** 2010. The role of signaling pathways in the development and treatment of hepatocellular carcinoma. *Oncogene* **29**:4989–5005.
92. **Zegers M. M., and D. Hoekstra.** 1998. Mechanisms and functional features of polarized membrane traffic in epithelial and hepatic cells. *Biochem. J.* **336 ( Pt 2)**:257–269.
93. **Zhang T., Y. Li, J.-P. Lai, S. D. Douglas, D. S. Metzger, C. P. O'Brien, and W.-Z. Ho.** 2003. Alcohol potentiates hepatitis C virus replicon expression. *Hepatology* **38**:57–65.
94. **Zhong J., P. Gastaminza, G. Cheng, S. Kapadia, T. Kato, D. R. Burton, S. F. Wieland, S. L. Uprichard, T. Wakita, and F. V. Chisari.** 2005. Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:9294–9299.

## 4 Complément : Modifications de la polarisation cellulaire

### 4.1 Introduction

La polarisation cellulaire joue un rôle important dans la physiologie hépatique (cf. §3.1.3). Les récepteurs d'entrée du HCV claudine-1 et occludine sont deux protéines impliquées dans l'établissement de la polarisation des hépatocytes, puisqu'elles font partie des jonctions serrées séparant les domaines membranaires apicaux et basolatéraux. Des études récentes utilisant des cellules HepG2 ont montré que la polarisation des hépatocytes inhibe l'entrée virale (Mee et al., 2009) et que l'infection par HCV serait responsable d'une dépolarisation, induite par l'expression du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) (Mee et al., 2010). Nous avons donc voulu déterminer, dans notre modèle cellulaire de réplication virale persistante en cellules HepG2, l'effet du HCV sur la polarité cellulaire.

### 4.2 Protocole expérimental

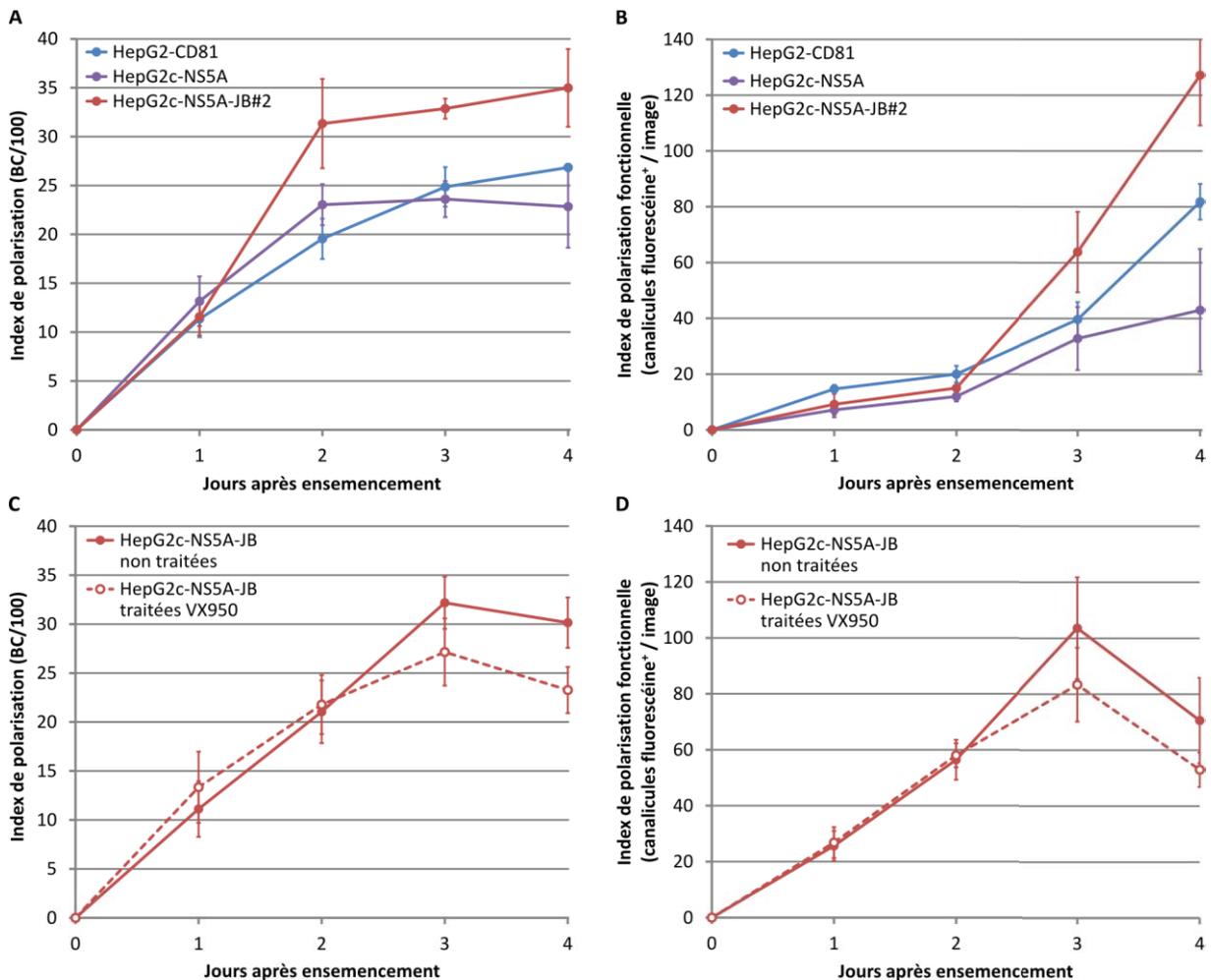
Afin de déterminer l'impact d'une réplication virale persistante sur la polarisation des cellules HepG2, nous avons réalisé une première expérience en comparant les cinétiques d'acquisition de polarisation dans trois lignées cellulaires, deux lignées contrôle et une lignée répliquant HCV de manière stable : HepG2-CD81, HepG2c-NS5A et HepG2c-NS5A-JB#2 (pour la description des lignées cellulaires, se reporter à l'article ci-dessus). Les cellules ont étéensemencées sur collagène, à une densité initiale de 20%, et cultivées en milieu sans antibiotique pour minimiser les différences de croissance et de physiologie cellulaire. La polarisation de ces cellules a été évaluée chaque jour pendant 4 jours, et avec deux méthodes différentes.

La première méthode de détermination de la polarisation repose sur un marquage du cytosquelette d'actine à la phalloïdine, permettant de repérer et de compter les accumulations canaliculaires d'actine. La détection des canalicules en cellules HepG2 par marquage du cytosquelette d'actine a été précédemment décrite et donne des résultats identiques au marquage de protéines spécifiques de la membrane canaliculaire telle que MDR1 (Van IJzendoorn et al., 2004). Les cellules sont lavées, fixées pendant 20 min avec 4% de paraformaldéhyde dans du PBS et à température ambiante, perméabilisées pendant 5 min avec du méthanol glacé, lavées au PBS, incubées pendant 1h avec du PBS contenant 1% de BSA, puis marquées à la phalloïdine-FluoProbes 547 (Interchim). Les cellules sont observées au microscope à épifluorescence et les foyers d'actine sont comptés et rapportés au nombre de cellules grâce à un marquage des noyaux au Dapi. Les résultats sont alors exprimés en nombre de canalicules biliaires pour 100 cellules (BC/100).

La seconde technique repose sur un marquage fonctionnel des canalicules biliaires. En effet, les hépatocytes polarisés sont capables d'excréter activement la fluorescéine via le pôle apical et de l'accumuler au niveau des canalicules biliaires. Ainsi, les cellules ont été incubées pendant 30 min à 37°C dans du milieu sans sérum contenant 20 µg/mL de fluorescéine (Sigma). Elles ont ensuite été lavées à l'obscurité avec du PBS préchauffé puis incubées de nouveau 5 min dans du milieu sans sérum à 37°C. Enfin, les cellules ont été lavées 2 fois au PBS préchauffé et observées immédiatement au microscope à épifluorescence pour compter les canalicules ayant accumulés la fluorescéine.

### 4.3 Résultats

De manière surprenante, la comparaison de cellules HepG2 non infectées et de cellules HepG2 répliquant HCV montre l'acquisition d'une polarisation plus importantes dans les cellules répliquant le génome viral (Figure 37A et B). En effet, il semblerait que les cellules HepG2 répliquant HCV possèdent plus de canalicules biliaires et que ceux-ci soient fonctionnels, suggérant une polarisation cellulaire plus importante. Cette hyperpolarisation semble dépendante de la réplication virale puisque le traitement des cellules avec un inhibiteur de la protéase virale, le VX950, inhibant la réplication du virus, entraîne une diminution de la polarisation cellulaire (Figure 37C et D).



**Figure 37.** Une réplication virale persistante modifie la polarisation cellulaire.

(A) & (B) Les cellules HepG2-CD81, HepG2c-NS5A et HepG2c-NS5A-JB#2 ont été ensemencées à 20% de confluence et la polarisation cellulaire a été déterminée chaque jour pendant 4 jours. (C) & (D) Les cellules HepG2c-NS5A-JB ont été ensemencées à 20% de confluence et incubées ou non avec 5  $\mu$ M d'inhibiteur de protéase virale (VX950) afin de supprimer la réplication virale. La polarisation cellulaire a été déterminée chaque jour pendant 4 jours. (A) & (C) Les canalicules biliaires formés sont dénombrés grâce à un marquage du cytosquelette d'actine à la phalloïdine, puis rapportés au nombre de cellules comptées grâce à un marquage des acides nucléiques au Dapi (BC/100 = nombre de canalicules biliaires pour 100 cellules). (B) & (D) Les canalicules biliaires fonctionnels sont dénombrés grâce à un marquage à la fluoresceïne (cf. protocole expérimental ci-dessus). Les barres d'erreur représentent l'écart-type des comptages réalisés sur 6 à 8 champs pris au hasard.

## 5 Conclusion

La construction d'un virus HCV contenant un gène de résistance à la blasticidine nous a permis d'obtenir une réplication virale persistante en cellules HepG2. Ces cellules HepG2-JB sont capables de répliquer l'ARN viral, d'exprimer les protéines virales et de produire des particules virales infectieuses.

La réplication de l'ARN viral en HepG2 peut être améliorée en traitant les cellules avec un inhibiteur de la voie MEK/ERK, mais ne semble pas augmentée par l'éthanol ou l'acide chénodésoxycholique (CDCA, un sel biliaire), qui pourraient tous deux être impliqués dans la régulation de la réplication virale (Zhang et al., 2003; Chang and George, 2007). De plus, la trans-complémentation des cellules HepG2 avec la protéine virale NS5A permet également d'augmenter la réplication. Par contre, aucune augmentation de la réplication virale n'a été observée en cellules Huh7.5, suite au traitement avec l'éthanol, le CDCA ou l'inhibiteur de la voie MEK/ERK. Ces premiers résultats concernant la modulation de la réplication virale mettent en évidence l'existence de différences entre les cellules HepG2 et Huh7.5, soulignant l'importance des modèles d'étude alternatifs du HCV.

Même si les quantités d'ARN viral sont comparables entre les cellules HepG2 et Huh7.5 qui répliquent le virus tagué à la blasticidine, le niveau d'expression des protéines virales est beaucoup plus faible en cellules HepG2, suggérant une traduction de l'ARN viral moins efficace. L'analyse des modifications ultrastructurales induites par la réplication virale en cellules Huh7.5 montre l'existence d'un regroupement des gouttelettes lipidiques dans des zones riches en vésicules à double membrane, ainsi que la présence d'une autophagie accrue. Ces modifications n'ont cependant pas été observées en cellules HepG2, soulignant une fois encore l'importance de l'utilisation de modèles cellulaires alternatifs.

Contrairement à ce qui a été décrit dans la littérature (Mee et al., 2009, 2010), nous avons observé que la réplication virale en cellules HepG2 entraîne une augmentation de leur polarisation. De plus, la réplication du HCV en cellules HepG2 semble augmenter la sécrétion d'apoB. Le virus permettrait ainsi d'augmenter la différenciation physiologique des cellules HepG2. Ces résultats encore préliminaires seront discutés ultérieurement.

Finalement, les cellules HepG2 répliquant HCV sont toujours capables de sécréter des VLDL, contrairement aux cellules Huh7.5. Malgré cette différence, les particules virales sécrétées par les deux types cellulaires ont une densité et une interaction avec les lipoprotéines de l'hôte comparables. En effet, les virions sont majoritairement associés à apoE, et peu, ou pas, associés à apoB, cette dernière apolipoprotéine ne jouant pas un rôle significatif au cours de l'entrée virale. Ainsi, des cellules capables de sécréter des VLDL, répliquant HCV à des taux comparables à ceux obtenus en cellules Huh7.5, ne semblent pas capables de sécréter de LVP. Ces résultats nous amènent à nous questionner quant à l'existence réelle d'une association entre HCV et apoB *in vivo*.



## CHAPITRE V : Discussion & perspectives

### 1 Sécrétion de lipoprotéines en culture cellulaire

Le système cellulaire le plus pertinent pour l'étude de l'assemblage et de la sécrétion des lipoprotéines *in vitro*, les hépatocytes primaires humains (PHH) provenant de résection hépatique, reste difficile d'accès et d'utilisation. Le développement d'outils permettant une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires impliqués dans l'assemblage et la sécrétion des VLDL reste donc d'actualité. Ainsi, l'étude de la morphogenèse des VLDL a été, jusqu'à présent, majoritairement réalisée en lignées d'hépatome, à savoir la lignée de rat McA-RH7777 (Borén et al., 1994) et la lignée humaine HepG2 (Dixon and Ginsberg, 1993; Fisher et al., 2011). Récemment, la sécrétion lipoprotéique des cellules d'hépatome Huh7 a également été caractérisée, mais il semblerait que ces cellules présentent une sécrétion lipoprotéique moins physiologique que les cellules HepG2 (Meex et al., 2011). Cependant, les cellules HepG2 et Huh7 sont des cellules cancéreuses, possédant un métabolisme très différent des hépatocytes différenciés composant le parenchyme hépatique (Guguen-Guillouzo and Guillouzo, 2010). Ces cellules peuvent être partiellement redifférenciées à l'aide d'un traitement au DMSO, présentant alors des caractéristiques fonctionnelles plus proches de la physiologie hépatique (Galbraith et al., 1988; Sainz and Chisari, 2006). C'est pourquoi nous avons caractérisé la production de lipoprotéines dans ces cellules d'hépatomes après les avoir partiellement redifférenciées.

Parmi les apolipoprotéines qui caractérisent les VLDL, apoB et apoE sont sans doute les plus importantes. En effet, apoB est indispensable à leur biogenèse, servant d'échafaudage à la lipoprotéine en l'enveloppant grâce à ses domaines amphiphiles (Blasiolo et al., 2007). ApoE possède, quant à elle, une forte affinité pour le récepteur aux LDL (LDLR), et est ainsi responsable de la clairance rapide des résidus de VLDL (Blasiolo et al., 2007). ApoE semble également impliquée dans la formation des VLDL à un stade précoce (Mensenkamp et al., 1999, 2001). Ainsi, il est important de vérifier la présence d'apoE en plus d'apoB100 sur les lipoprotéines sécrétées *in vitro*, afin d'évaluer la pertinence des modèles cellulaires utilisés vis-à-vis de la biogenèse des VLDL. Nous avons donc analysé dans cette étude la répartition en densité d'apoB100 et d'apoE, leur co-sédimentation dans les fractions de très faible densité et leur co-immunoprécipitation, permettant de caractériser la production physiologique de VLDL.

Notre étude a permis d'apporter de nouvelles informations concernant l'influence du statut de différenciation des cellules sur la production de VLDL. En effet, la production de VLDL par les PHH est limitée dans le temps et semble dépendre de leur statut de différenciation et de polarisation (observations morphologiques). Les cellules d'hépatome Huh7.5 et HepG2 sont peu différenciées et polarisées dans les conditions usuelles de culture et ne sécrètent pas ou très peu de VLDL, positives à la fois pour apoB100 et apoE. Cependant, quand ces cellules sont confluentes, établissent des jonctions intercellulaires, diminuent leur prolifération et acquièrent une polarisation fonctionnelle, elles semblent capables de produire des VLDL plus ou moins lipidées. Ainsi, la redifférenciation de ces cellules d'hépatome après 4 jours de traitement au DMSO semble augmenter leur sécrétion de particules contenant apoB100 et apoE. La différence subsistant entre les cellules Huh7.5 et HepG2 est la densité de sécrétion des lipoprotéines. En effet, les cellules Huh7.5, même différenciées ne semblent pas capables de produire des lipoprotéines de très faible densité. On pourrait donc supposer l'existence dans ces cellules d'un défaut de lipidation des lipoprotéines après leur

assemblage. Ainsi, une perspective intéressante de ces travaux serait de caractériser les changements d'expression des enzymes impliquées dans l'assemblage et la maturation des VLDL, au cours de la redifférenciation partielle des cellules d'hépatome, et permettant d'expliquer l'évolution de leur phénotype. Cette étude permettrait de mieux contraindre les facteurs impliqués dans la morphogenèse des lipoprotéines et de les mettre en relation avec l'assemblage et la sécrétion du HCV.

Nous avons également montré que les cellules HepaRG, des progéniteurs bipotents du foie, pourraient représenter un modèle cellulaire alternatif d'étude des VLDL. Ces cellules peuvent en effet être différenciées préférentiellement en hépatocytes par addition de DMSO et d'EGF, et sont alors capables de sécréter des VLDL physiologiques, même si la production est moindre comparée à celle des PHH. Il serait donc important de mieux caractériser leur production de VLDL et les traitements permettant de l'augmenter, mais aussi la régulation intracellulaire de l'assemblage des lipoprotéines apoB-positives, afin d'obtenir des données concernant la biogenèse des VLDL dans des cellules non transformées possédant une physiologie proche de celle des hépatocytes primaires. Les cellules HepaRG pourraient constituer un modèle intéressant pour étudier les relations entre la réplication du HCV et le métabolisme des lipoprotéines. Cependant, ces cellules ne sont pas permissives à la réplication virale. Néanmoins, l'expression individuelle et conditionnelle des protéines virales dans ces cellules devrait permettre d'analyser l'impact des protéines virales sur le métabolisme des lipoprotéines, afin de mieux comprendre l'origine de l'hypobétalipoprotéïnémie (Serfaty et al., 2001; Petit et al., 2003) et des autres dérégulations lipoprotéiques observées *in vivo*.

## 2 Analyses de l'ultrastructure subcellulaire

De nombreux virus induisent une altération de l'ultrastructure subcellulaire, et notamment des membranes intracellulaires, permettant leur réplication (Miller and Krijnse-Locker, 2008). C'est notamment le cas du virus de la dengue, un proche parent du HCV appartenant à la famille des *Flaviviridae* et au genre *Flavivirus*, capable d'induire une profonde réorganisation des membranes du RE et une accumulation des LD permettant sa réplication et son assemblage (Samsa et al., 2009; Welsch et al., 2009). A l'instar du virus de la dengue, le virus de l'hépatite C (HCV) entraîne une réorganisation des membranes du RE (Egger et al., 2002; Gosert et al., 2003; Miller and Krijnse-Locker, 2008) et une accumulation des LD (Depla et al., 2010), afin de permettre sa réplication et son assemblage. Ces modifications ultrastructurales ayant été observées dans le contexte d'une surexpression des protéines virales ou d'une infection aiguë à forte multiplicité d'infection (MOI), nous avons voulu observer leur présence et leur évolution au cours d'une infection établie dans des cellules Huh7.5 partiellement redifférenciées par un traitement au DMSO (Sainz and Chisari, 2006). En effet, l'infection de cellules Huh7.5 préalablement redifférenciées est moins efficace qu'en cellules prolifératives, avec une propagation virale plus lente et un niveau de réplication intracellulaire plus faible (10 à 100 fois moins d'ARN HCV intracellulaire), ce qui apparaît plus pertinent d'un point de vue physiologique.

Nous avons observé, dans les cellules Huh7.5 partiellement redifférenciées au DMSO et infectées par HCV, une augmentation du nombre de LD, leur regroupement dans des structures contenant des vésicules à double membrane (DMV) et une augmentation importante de la surface cellulaire occupée par des structures autophagiques, suggérant une induction de ces dernières ou une inhibition de la progression du processus autophagique (cf. Chapitre IV, Table 2). Ces

observations sont en accord avec la littérature, bien que les différences observées ici semblent beaucoup moins marquées que dans le cas de la réplication d'un réplicon sous-génomique dans ces mêmes cellules (Ferraris et al., 2010). L'induction de l'autophagie a été confirmée *in vivo*, avec une augmentation significative du nombre de vésicules autophagiques dans les hépatocytes des patients infectés (Rautou et al., 2011).

Par contre, nous n'avons pas observé de différence significative concernant l'association des LD avec des membranes du RE, contrairement à ce qui avait été décrit en cellules Huh7 (Miyanari et al., 2007). Ces auteurs avaient en effet observé l'apposition de membranes sur les LD, en cas d'infection virale uniquement, les cellules naïves ne présentant pas d'interaction entre LD et RE. L'absence d'interaction entre LD et RE dans les cellules Huh7 contraste avec nos résultats obtenus en Huh7.5 partiellement redifférenciées, mais également avec d'autres observations réalisées dans des modèles cellulaires différents. En effet, les LD naissent au niveau du RE et de nombreuses études rapportent l'association des LD cytosoliques avec le RE : dans des adipocytes (Martin and Parton, 2006), des fibroblastes (Murphy et al., 2009), des macrophages (Robenek et al., 2009) et des hépatocytes (Ozeki et al., 2005; Ohsaki et al., 2008, 2009). Cependant, l'observation d'appositions membranaires sur les LD semble difficile dans les hépatocytes à cause d'une forte dynamique des LD. Elle n'est réalisée facilement que dans un contexte de traitement des cellules avec des inhibiteurs de protéasome ou de la bafilomycine, ou en cas de modification de l'expression de protéines cellulaires associées aux LD (Ozeki et al., 2005; Ohsaki et al., 2008). L'hypothèse que le traitement au DMSO permettrait une observation plus facile de cette association n'est pas à exclure, et pourrait expliquer la divergence de résultat entre l'étude réalisée précédemment (Miyanari et al., 2007) et la nôtre.

Les résultats que nous avons obtenus en cellules Huh7.5 et HepG2 répliquant le virus JFH1-BSD sont à analyser avec un minimum de circonspection. En effet, nous avons observé les modifications ultrastructurales décrites ci-dessus dans les cellules Huh7.5-JB (cf. Chapitre IV, Table 2), mais pas dans les cellules Huh7.5-JB-NS5A (données non présentées). Comment expliquer cette apparente contradiction ? La surface observée en microscopie électronique est inférieure à 1 mm<sup>2</sup> et contient donc peu de cellules (souvent moins de 200). De plus, les niveaux de réplication et d'expression des protéines virales sont plus variables dans les cellules Huh7.5-NS5A-JB que dans les cellules Huh7.5 infectées avec un virus JFH1 (cf. Chapitre IV, Figure supplémentaire 3), les cellules les plus fortement positives étant regroupées. Ceci suggère une importance forte du microenvironnement cellulaire sur le niveau de réplication et d'expression des protéines virales. Au cours de la préparation des cellules pour les analyses en microscopie électronique, il est donc possible d'échantillonner une zone faiblement positive pour l'expression des protéines virales. Ceci pourrait donc expliquer l'absence de modifications observée pour les cellules Huh7.5-NS5A-JB, cette expérience n'ayant pas été reproduite par manque de temps.

Néanmoins, il est nécessaire de garder à l'esprit que toutes ces cellules résistent à de fortes concentrations de blasticidine (jusqu'à 40 µg/mL) et expriment donc la protéine NS5A taguée avec la blasticidine S désaminase (BSD). Théoriquement, toutes les cellules de la culture répliquent ainsi l'ARN viral et expriment la polyprotéine virale, suggérant qu'un fort niveau d'expression des protéines virales est nécessaire pour permettre l'observation en microscopie électronique de modifications ultrastructurales dans les cellules infectées. Cette hypothèse semble confirmée par l'absence de modifications ultrastructurales en cellules HepG2 répliquant le virus JFH1-BSD ou un réplicon sous-génomique (SGR) (cf. Chapitre IV, Table 2). La souche virale JFH1 possédant une capacité répliquative accrue et hors-norme, ayant permis la mise en place d'un système répliquatif

complet *in vitro*, il est donc important de se questionner quant à la pertinence physiologique des modifications ultrastructurales observées avec ce système *in vitro*. Certains réarrangements membranaires observés pourraient provenir d'un excès de protéines virales, sans être directement impliqués dans la réplication et/ou l'assemblage du virus de l'hépatite C.

Afin de compléter ces travaux, des immuno-marquages dirigés contre la protéine virale core vont être réalisés sur les coupes déjà obtenues. Ces marquages permettront de distinguer les cellules analysées en fonction de leur taux de positivité pour l'antigène viral, mais également de repérer les structures cellulaires positives et potentiellement impliquées dans la réplication et/ou l'assemblage. La réalisation de ces immuno-marquages devrait permettre de conclure quant à l'existence de différences entre les cellules Huh7.5 et HepG2, vis-à-vis de l'induction de modifications ultrastructurales. Pour tester l'hypothèse que les modifications ultrastructurales observées dépendraient du niveau d'expression des protéines virales, il serait intéressant de moduler le taux de réplication intracellulaire par divers traitements antiviraux à des concentrations sous-optimales ou en utilisant des composés tel U0126, permettant une augmentation de la réplication. Il serait également important de surexprimer les différentes protéines virales en cellules HepG2 afin de déterminer si les différences observées sont imputables au niveau d'expression des protéines virales ou au type cellulaire utilisé.

Il est intéressant de noter que l'analyse *in vivo* de la positivité des hépatocytes pour différentes protéines virales montre l'existence de niveaux d'expression hétérogènes (Liang et al., 2009). Les cellules positives semblent regroupées, formant des zones de positivité, similaires à celles que nous avons observées *in vitro*. HCV infecte-t-il seulement un faible pourcentage des hépatocytes *in vivo* ? Ou tous les hépatocytes sont-ils infectés, avec des niveaux variables d'expression des antigènes viraux, parfois inférieurs aux limites de détection des techniques utilisées ?

### **3 Influence du virus sur la polarisation et la physiologie cellulaires**

La polarisation des hépatocytes joue un rôle fondamental dans leur fonction physiologique, permettant notamment la séparation physique des milieux interne (sang sinusoidal) et externe (bile) (cf. §3.1.3 de l'introduction). Elle jouerait également un rôle important au cours de l'infection virale, étant donnée la localisation des récepteurs d'entrée. En effet, les protéines claudine (CLDN-1) et occludine (OCLN) sont toutes deux des protéines des jonctions serrées. Dans les cellules d'hépatome polarisées HepG2, la protéine CLDN-1 est localisée au niveau des jonctions serrées, mais aussi au niveau de la membrane basolatérale, alors que la protéine OCLN est située au niveau des jonctions serrées et de la membrane apicale (Mee et al., 2010). L'entrée virale nécessitant l'intervention des deux protéines cellulaires, un modèle d'entrée virale a été suggéré, par analogie avec le virus Coxsackie B (CVB). En effet, ce virus transmis par voie fécale ou orale est capable d'infecter les cellules épithéliales de l'intestin pour pouvoir être disséminé dans le milieu interne. Il possède deux récepteurs cellulaires, un situé au niveau de la membrane apicale, l'autre au niveau des jonctions serrées. L'interaction avec le récepteur apical déclenche une signalisation intracellulaire entraînant la migration des récepteurs vers les jonctions serrées où le virus peut alors interagir avec le second récepteur et entrer dans la cellule (Coyne and Bergelson, 2006). Par analogie, HCV pourrait interagir avec CD81 et CLDN-1, puis migrer vers les jonctions serrées où l'interaction avec OCLN permettrait l'entrée du virus (Figure 15) (Meredith et al., 2012; Ploss and Evans, 2012). Ainsi, une étude a récemment démontré que la polarisation cellulaire inhibe l'entrée du HCV en recrutant le récepteur

CLDN-1 au niveau des jonctions serrées, limitant donc son interaction avec le virus au niveau de la membrane basolatérale (Mee et al., 2009). Le virus serait également capable d'induire une dépolarisation des hépatocytes permettant d'augmenter leur susceptibilité à l'infection (Mee et al., 2010).

Un autre aspect important de la physiologie des hépatocytes est leur capacité à sécréter des VLDL, contenant apoB (cf. §3.2.4 de l'introduction). HCV a été associé à une hypobétalipoprotéïnémie chez 5 à 50% des patients, en fonction du génotype viral (Serfaty et al., 2001; Petit et al., 2003), suggérant que l'infection virale entraînerait un défaut de sécrétion des VLDL. Dans une autre étude, l'activité de la protéine MTP a été négativement corrélée à la stéatose induite par HCV, surtout dans le contexte d'une infection de génotype 3 (Mirandola et al., 2006). Enfin, des études *in vitro* ont montré une diminution de l'activité de la MTP et de la sécrétion d'apoB suite à l'expression de la protéine virale core ou d'un réplicon sous-génomique (Perlemuter et al., 2002; Mancone et al., 2012). L'expression de la protéine core induit également une accumulation de triglycérides (Abid et al., 2005), qui pourrait être une conséquence de l'inhibition de la production de VLDL (Perlemuter et al., 2002), mais aussi d'une modification de la motilité et de la disponibilité des LD (Harris et al., 2011).

De manière surprenante, et en contradiction avec les données de la littérature, nous avons observé dans les cellules HepG2-NS5A-JB (répliquant le virus JFH1-BSD de manière persistante) une augmentation de la polarisation cellulaire et de la sécrétion d'apoB. Dans ce modèle, la réplication virale chronique semble ainsi promouvoir la polarisation et la différenciation des hépatocytes, les deux processus étant interconnectés. Cet effet est dépendant de la réplication virale puisqu'un traitement de 4 jours avec un inhibiteur de la protéase virale, le VX950, permet de restaurer une polarisation et une sécrétion d'apoB plus faibles. Ces observations nous amènent à proposer un modèle où l'infection virale aiguë, avec un fort taux d'expression des protéines virales, entraînerait une dépolarisation et une diminution de la sécrétion d'apoB, alors que l'infection chronique, avec une expression plus faible des protéines virales, pourrait promouvoir la différenciation cellulaire. Ainsi, les hépatites C récurrentes se développant suite à une transplantation hépatique et qui sont particulièrement virulentes, avec une réplication virale importante, entraînent l'apparition, dans 2 à 5% des cas, d'une cholestase, résultant de la dépolarisation des hépatocytes et compromettant l'intégrité des jonctions serrées séparant la bile du sang (Gane, 2008). En cas d'hépatite C chronique par contre, les cas de cholestase sont beaucoup plus rares, suggérant une préservation de la polarisation des hépatocytes. De plus, l'hyperpolarisation cellulaire pourrait être un frein à la réponse immunitaire de l'hôte en inhibant l'infiltration lymphocytaire au sein du parenchyme infecté.

L'analyse plus approfondie du rôle de la réplication virale sur la polarisation et la sécrétion de lipoprotéines permettrait de mieux comprendre la physiopathologie de l'hépatite C chronique. Il serait notamment intéressant d'utiliser ce modèle HepG2-JB afin d'étudier l'impact de la réplication virale sur la polarisation des cellules infectées, mais aussi des cellules adjacentes naïves. Ce modèle serait également fort utile pour analyser l'influence de la polarisation cellulaire sur l'assemblage et la sécrétion des particules virales, ainsi que sur la transmission du virus de cellule à cellule, un moyen de transmission virale moins sensible aux anticorps neutralisants et permettant une propagation rapide du virus (Timpe et al., 2008; Witteveldt et al., 2009; Brimacombe et al., 2011).

## 4 Interactions avec les facteurs de croissance

Les voies de signalisation régulées par les facteurs de croissance tels que l'EGF et le VEGF semblent jouer un rôle crucial dans la carcinogenèse hépatique (Whittaker et al., 2010). La compréhension de l'interaction du HCV avec ces voies de signalisation est donc de première importance dans la compréhension de la carcinogenèse associée à HCV et dans l'élaboration de traitements anticancéreux efficaces.

D'après les travaux du groupe de Jane McKeating, l'infection virale entraînerait une augmentation de la sécrétion du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), responsable d'une dépolarisation des hépatocytes avec délocalisation de l'occludine vers la membrane basolatérale, permettant ainsi d'augmenter l'entrée virale (Mee et al., 2010). Le VEGF est un facteur de croissance important impliqué dans la vasculogenèse, l'angiogenèse, le chimiotactisme et la vasodilatation des vaisseaux sanguins. Il est très étudié dans le cadre de l'angiogenèse tumorale puisqu'il permet le développement des vaisseaux sanguins nécessaires à l'oxygénation des tumeurs et constitue ainsi une cible de choix des traitements anticancéreux (Carmeliet and Jain, 2011). Le VEGF-A est majoritairement reconnu par le récepteur cellulaire VEGFR2. C'est un récepteur de type tyrosine kinase dont la dimérisation déclenche l'autophosphorylation et l'activation. La fixation du VEGF-A à son récepteur entraîne l'activation de voies de signalisation impliquées dans la migration et la survie cellulaire (FAK, PI3K/Akt), ainsi qu'une forte activation, via la kinase PKC, de la voie MEK/ERK, impliquée dans la prolifération cellulaire (Zachary, 2003). En plus de ses fonctions vasculaires, le VEGF est également impliqué dans le guidage axonal, comme le récepteur aux éphrines (EPH) et les neurophilines (Carmeliet and Jain, 2011). En effet, il existe de nombreuses similitudes entre le guidage axonal et le guidage des cellules endothéliales au cours de la vasculogenèse, permettant l'élongation et le branchement des vaisseaux sanguins. Récemment, il a été montré chez la souris que l'activation du récepteur à l'EGF dans les cellules tumorales avait, entre autres, pour conséquence la sécrétion de VEGF suite à l'activation de la voie MEK/ERK, permettant ainsi une signalisation autocrine du VEGF. Cette synergie entre l'EGFR et le VEGF entraîne une forte prolifération cellulaire via l'activation de la voie MEK/ERK et promeut le développement des cancers épithéliaux (Lichtenberger et al., 2010).

Il est donc très intéressant de noter que des études récentes ont pu identifier une dépendance du HCV vis-à-vis du récepteur à l'EGF et d'un récepteur aux éphrines (EphA2) (Lupberger et al., 2011). En effet, l'activité de ces récepteurs tyrosine kinase (RTK) semble nécessaire à l'entrée virale et serait impliquée dans une redistribution de CLDN-1, facilitant son interaction avec CD81, ainsi que dans une potentialisation de la fusion membranaire dépendant du pH, entre l'enveloppe virale et la membrane des endosomes (Lupberger et al., 2011). L'action provirale de ces RTK pourrait être relayée par des membres de la voie de signalisation MEK/ERK (Thomas Baumert, communication personnelle). La signalisation en aval de l'EGFR comprend en effet deux voies principales, la voie PI3K/Akt, impliquée dans la survie cellulaire, et la voie MEK/ERK, contrôlant notamment la prolifération cellulaire (Gedaly et al., 2010; Lichtenberger et al., 2010; Whittaker et al., 2010). La signalisation en aval d'EphA2 est complexe et encore mal caractérisée. Elle entraînerait notamment l'activation de la kinase des adhésions focales (FAK), impliquée dans la motilité cellulaire, et interférerait avec la voie MEK/ERK, entraînant son inhibition ou son activation, en fonction du contexte de stimulation (Lackmann and Boyd, 2008).

Un lien supplémentaire entre HCV et la voie MEK/ERK a été récemment identifié : l'endocytose de nucléocapsides virales non enveloppées, présentes dans le sérum des patients infectés, semble induire l'activation de la voie de signalisation MEK/ERK, participant potentiellement à la pathogenèse virale *in vivo* (Katsarou et al., 2010).

Finalement, il semblerait que les étapes précoces du cycle viral dépendent de l'activité des RTK et soient responsables d'une induction de la voie MEK/ERK. Ainsi, les étapes précoces du cycle seraient reliées à une dépolarisation et/ou dédifférenciation des hépatocytes permettant notamment d'expliquer l'existence de cholestases chez les patients transplantés qui subissent une réinfection massive du greffon (Gane, 2008).

D'autre part, l'activité des kinases MEK et ERK a été impliquée dans la lipogenèse et la synthèse des VLDL. En effet, une inhibition de MEK1/2 avec le composé U0126 dans les cellules HepG2 entraîne une accumulation de la quantité cellulaire totale et microsomale de triglycérides, une augmentation de la transcription des ARN messagers des enzymes DGAT1 et DGAT2, et une amélioration de la sécrétion de VLDL (Tsai et al., 2007). L'inhibition de la voie MEK/ERK permet également d'augmenter la réplication du HCV et la production de particules virales en cellules Huh7, probablement grâce à la modification des statuts de phosphorylation des protéines non structurales virales (Ndjomou et al., 2009). Enfin, nous avons obtenu des résultats similaires en cellules HepG2 répliquant chroniquement un virus JFH1-BSD. Il semblerait donc qu'en contexte d'infection chronique, l'activation de la voie de signalisation MEK/ERK soit délétère à la réplication virale et à la production de particules virales, intimement reliées au métabolisme lipidique de la cellule.

Une fois encore, on observe un comportement viral contradictoire quand on compare les étapes précoces du cycle viral aux étapes tardives de réplication et de production de particules virales au cours de l'infection chronique. Ces résultats montrent bien que l'implication de la voie MEK/ERK au cours du cycle viral du HCV reste encore mal comprise. Néanmoins, il est important de garder à l'esprit que la stimulation des cellules par différents facteurs de croissance utilisant la voie MEK/ERK entraîne une organisation topologique variable du réseau de kinases impliqué dans cette voie, permettant la transduction de signaux différents (Santos et al., 2007). Ainsi, la stimulation courte de la voie MEK/ERK pourrait favoriser la prolifération alors qu'une stimulation durable de cette voie favoriserait une différenciation cellulaire (Santos et al., 2007). Il serait donc intéressant d'étudier l'effet de la stimulation des cellules HepG2-JB par différents facteurs de croissance, seuls ou en combinaison, sur la réplication virale, la production de particules virales et de lipoprotéines, et la polarisation cellulaire.

## **5 Structure et composition des particules virales *in vitro* et *in vivo***

Comme nous l'avons vu au cours de l'introduction, la biogenèse des lipoprotéines, et plus particulièrement des VLDL, semble jouer un rôle important dans l'assemblage et la sécrétion de particules virales infectieuses. S'il a été montré qu'apoE est fortement associée aux particules virales sécrétées *in vitro* et à leur infectivité, les données démontrant une association spécifique avec apoB restent équivoques. Etant donné que nos cellules HepG2 répliquant le virus JFH1-BSD produisent des particules virales infectieuses en quantité suffisante, nous avons pu les utiliser pour caractériser l'association des virions avec les lipoprotéines de l'hôte. Nous avons montré que les cellules HepG2 produisent des particules virales similaires à celles produites en Huh7.5 et précédemment décrites dans la littérature, contenant apoE mais pas apoB (Owen et al., 2009; Merz et al., 2011), et nous

avons montré que les particules virales ainsi produites ne sont pas neutralisées avec un anticorps neutralisant l'interaction d'apoB avec le récepteur aux LDL. De plus, les particules sécrétées par ces deux types cellulaires possèdent une densité similaire, avec une absence d'ARN viral et de particules infectieuses dans les fractions de très faible densité correspondant aux VLDL. Ceci suggère que, malgré leur capacité à produire des VLDL, les cellules HepG2 ne sécrètent pas de lipo-viro-particules (LVP) résultant d'une association en cours de morphogénèse des particules virales produites avec les VLDL (contenant apoB). Ces travaux motivent la réalisation d'expériences complémentaires pour confirmer l'existence d'une réelle association physique du HCV, et notamment de l'ARN viral, avec les lipoprotéines de l'hôte contenant apoB *in vivo*. En effet, une étude récente a montré que les LVP observées *in vivo* pourrait être en grande majorité des particules positives pour apoB et les glycoprotéines d'enveloppe virale E1 et E2, mais ne contenant pas la nucléocapside (Scholtes et al., 2012), constituant ainsi des particules sous-virales défectives. De telles particules sous-virales avaient déjà été décrites *in vitro*, suite à la surexpression des glycoprotéines d'enveloppe virales en cellules HepG2 ou Caco-2 (Icard et al., 2009).

D'après les données obtenues *in vitro*, les particules virales infectieuses semblent associées aux lipoprotéines de l'hôte, mais elles seraient uniquement associées à apoE et non apoB, contrairement à ce qui a été suggéré *in vivo* (André et al., 2002; Nielsen et al., 2006). Les données obtenues chez les patients ne sont pas très robustes car elles proviennent principalement d'approches par immunoprécipitation, suivie de la détection de l'ARN viral par PCR quantitative, pouvant générer des faux positifs, surtout lors de l'utilisation d'échantillons cliniques. De plus, la démonstration d'une interaction physique entre les constituants viraux et lipoprotéiques après purification des particules virales sériques n'a pas encore été apportée. En effet, les charges virales faibles chez les patients infectés, ainsi que la nature lipophile des virions, rendent difficile l'analyse de la composition et de la structure des particules virales sériques.

Deux hypothèses différentes permettraient d'expliquer l'existence des LVP. La première, faisant état d'une morphogénèse intracellulaire commune entre HCV et les VLDL, est l'hypothèse privilégiée actuellement (André et al., 2005; Bartenschlager et al., 2011). La lipidation différentielle des particules virales ainsi sécrétées pourrait modifier leur densité et expliquer l'hétérogénéité observée *in vivo* (Lindenbach et al., 2006; Felmlee et al., 2010). La seconde hypothèse serait la formation extracellulaire de ces LVP, par fusion entre les particules virales contenant apoE et les lipoprotéines contenant apoB (VLDL, LDL, chylomicrons), permettant ainsi la formation de particules hybrides. Cette deuxième hypothèse pourrait expliquer les changements rapides de densité observés suite à un apport alimentaire riche en lipides (Felmlee et al., 2010), ainsi que l'association de l'ARN viral avec apoB100 (hépatique), comme avec apoB48 (intestinal) (Diaz et al., 2006).

Ainsi, il serait important d'identifier *in vivo* comme *in vitro* les facteurs impliqués dans la régulation de la densité des particules virales sécrétées en réponse aux apports alimentaires et de déterminer si la modulation de la densité des particules virales pourrait avoir un impact sur la persistance et la pathogénèse virale au cours de l'hépatite C chronique.

## 6 Importance des conditions de culture cellulaire

Comme nous l'avons vu précédemment, les facteurs de croissance influencent la réplication virale, mais aussi la production de particules virales et de lipoprotéines, notamment via la modulation de l'activité de la voie de signalisation MEK/ERK. Les sérums de veau fœtal (FCS) sont

utilisés en culture cellulaire afin de stimuler la croissance et la prolifération des cellules cultivées. Ces sérums contiennent en effet des facteurs de croissance, capables notamment d'activer les récepteurs tyrosine kinase. Ainsi, à l'instar de l'EGF humain, le FCS induit une activation de la voie MEK/ERK, entraînant une augmentation de la prolifération cellulaire (Giehl et al., 2000). Malheureusement, la nature des sérums utilisés dans les différentes études n'est, la plupart du temps, pas mentionnée, et lorsque c'est le cas, la composition exacte de ce sérum n'est pas connue. Ainsi, les conditions de culture variables employées dans les différents laboratoires peuvent expliquer une certaine divergence des résultats obtenus. Nous avons réalisé des tests au laboratoire en cultivant des cellules Huh7.5 et HepG2 pendant 2 semaines en présence de différents lots de sérums, provenant de fournisseurs différents, puis en quantifiant la sécrétion d'apoB par ELISA. Nous avons observé jusqu'à un facteur 4 de différence dans la quantité d'apoB sécrétée, en fonction du sérum utilisé, illustrant l'importance des conditions de culture sur la physiologie cellulaire.

La culture des hépatocytes en milieu sans sérum est possible, à condition de compléter le milieu avec diverses molécules. Il a été décrit qu'une réplication virale durable était possible en cellules Huh7 cultivées sans sérum et en présence de sélénium et d'albumine riche en lipides (Abe et al., 2007). La sécrétion des particules virales infectieuses a également été analysée dans des conditions de culture sans sérum, avec présence de sélénium, d'insuline et de transferrine (Akazawa et al., 2011). Les conditions de culture semblent avoir un impact important sur la composition des particules virales et leur infectivité. Curieusement, il semblerait que, dans cette étude, les particules virales produites en l'absence de sérum soient moins fortement associées à apoE et soient résistantes à la neutralisation avec des anticorps dirigés contre apoB et apoE. Ces résultats pourraient expliquer partiellement les résultats que nous avons obtenus, à savoir l'absence de neutralisation des particules virales produites en HepG2 avec un anticorps anti-apoB. Néanmoins, les résultats de cette publication sont surprenants, dans la mesure où moins de 20% d'association de l'ARN viral avec les apolipoprotéines en présence de sérum permet une neutralisation de l'infectivité approchant les 70% en utilisant des anticorps anti-apoE (Akazawa et al., 2011).

Il est également très surprenant de constater que la culture des hépatocytes, dans la plupart des travaux concernant HCV, est réalisée en milieu DMEM contenant 4,5 g/L de glucose. Or, la concentration physiologique en glucose au niveau de la veine porte varie entre 0,8 et 2,5 g/L environ, étant la plupart du temps proche de 1. Nous travaillons donc continuellement en condition d'hyperglycémie, propice au développement d'une résistance à l'insuline cellulaire, et modifiant la sensibilité des voies de signalisation régulant le métabolisme gluco-lipidique. Ces conditions de culture ont certainement un impact sur le stockage intracellulaire de triglycérides et la synthèse des VLDL, sans parler du cycle viral. L'analyse de l'influence de la concentration en glucose du milieu de culture sur la physiologie cellulaire et la réplication du virus de l'hépatite C pourrait permettre des avancées importantes.

Enfin, la plupart des études, comme ici d'ailleurs, sont réalisées en système de culture bidimensionnel, peu polarisé. Or, la différenciation et la polarisation des cellules semblent influencer fortement le métabolisme cellulaire et la sécrétion des VLDL. En effet, nous avons observé que la confluence des cellules modifie la quantité d'apoB sécrété. Plus les cellules Huh7.5 sont confluentes, diminuent leur prolifération et augmentent leur polarisation, plus elles sécrètent d'apoB. Nos expériences préliminaires ont également suggéré que la culture tridimensionnelle des cellules Huh7.5 dans une couche de matrigel permettrait encore d'augmenter la polarisation des hépatocytes et leur sécrétion d'apoB. Nous projetons donc de caractériser la production de VLDL et de particules

virales dans un système tridimensionnel de culture cellulaire, dans le but de se rapprocher le plus possible de la physiologie hépatique. En effet, dans la littérature, plusieurs études récentes ont décrit la réplication du HCV dans différents systèmes de culture 3D. La culture des cellules en matrigel (Molina-Jimenez et al., 2012) ou l'utilisation de systèmes de culture rotatifs permettant une croissance 3D des cellules (Aly et al., 2009; Sainz et al., 2009; Barrila et al., 2010) permettent ainsi une meilleure polarisation fonctionnelle des cellules Huh7 et entraînerait la sécrétion de particules HCV de plus faible densité (Sainz et al., 2009; Molina-Jimenez et al., 2012).

## **7 Modèles cellulaires alternatifs de réplication du HCV**

Les hépatocytes primaires humains (PHH) constituent un modèle de choix pour l'étude du HCV *in vitro*. Récemment, plusieurs équipes de recherche ont été capables de répliquer HCV en PHH, grâce à l'utilisation de conditions de culture particulières et complexes. Ainsi, la culture des PHH sur une matrice de collagène, et en utilisant un milieu de culture complexe permettrait la réplication du HCV et la production de particules virales infectieuses (Buck, 2008; Podevin et al., 2010). La co-culture des PHH avec des cellules hépatiques étoilées ou des fibroblastes murins semble également permettre une réplication durable du HCV et pourrait être un modèle de choix pour tester les nouveaux traitements antiviraux *in vitro* (Banaudha et al., 2010; Ploss et al., 2010; Zeisel et al., 2010). Enfin, une étude récente décrit l'infection productive de sections hépatiques, permettant d'étudier l'infection virale dans le contexte physiologique du foie avec présence de tous les types cellulaires hépatiques (Lagaye et al., 2012). Cependant, l'utilisation d'hépatocytes primaires ou de biopsies hépatiques reste difficile, de par la faible accessibilité des prélèvements hépatiques, encore diminuée par les progrès diagnostics et thérapeutiques limitant l'occurrence des biopsies et résections ; et de par la forte hétérogénéité inter- et intra-individuelle des échantillons.

Le développement d'autres modèles cellulaires, tels que les lignées cellulaires HepG2, Hep3B et PLC (Kambara et al., 2012; Sainz et al., 2012b), et l'utilisation d'hépatocytes fœtaux (Lázaro et al., 2007) ou d'hépatocytes provenant de l'induction de cellules souches pluripotentes (iPS) (Yoshida et al., 2011), sont donc un atout dans la compréhension du HCV. Il serait utile de caractériser également la sécrétion des VLDL dans ces différents modèles cellulaires afin de déterminer leur intérêt dans la compréhension de l'association des particules virales avec les lipoprotéines de l'hôte.

## **8 Influence de la réplication virale sur le métabolisme des lipoprotéines**

L'influence du métabolisme des lipoprotéines sur l'assemblage de particules virales infectieuses est de mieux en mieux caractérisée. Par contre, l'impact de l'infection virale sur l'assemblage et la sécrétion des lipoprotéines est encore peu étudié. La plupart des travaux se sont concentrés sur l'accumulation de TG et l'inhibition de la MTP induites par la protéine virale core, mais peu d'études se sont intéressées aux autres protéines virales ou au virus complet. Il serait intéressant d'estimer la contribution directe de la réplication virale aux dérégulations du métabolisme lipidique observées *in vivo*. Ainsi, l'utilisation de modèles cellulaires alternatifs, possédant un métabolisme lipoprotéique plus physiologique que le modèle Huh7, prend toute sa signification. Nous projetons donc de réaliser une étude plus approfondie de la modification du métabolisme des lipoprotéines en cellules HepG2 répliquant le virus JFH1-BSD.

L'utilisation du modèle HepaRG pourrait également permettre l'analyse du métabolisme des lipoprotéines dans un contexte non transformé. Différentes lignées HepaRG exprimant chacune des protéines virales de manière inductible ont été générées au laboratoire et sont en cours de caractérisation. L'utilisation de ces lignées permettra d'identifier les protéines virales impliquées dans une dérégulation quantitative et/ou qualitative de la sécrétion des VLDL, en analysant dans un premier temps la répartition en gradient des apolipoprotéines apoB et apoE. En parallèle, un système d'expression inductible du génome viral complet est en cours de développement. Il permettra l'expression de l'ARN viral dans des cellules HepaRG différenciées, possédant la plupart des caractéristiques physiologiques des hépatocytes différenciés. Nous espérons ainsi être en mesure d'établir une répllication virale persistante du HCV et une sécrétion de particules virales en cellules HepaRG.

## **9 Conclusion**

A l'aide d'un modèle cellulaire alternatif, à savoir des cellules d'hépatome HepG2 répliquant un virus JFH1-BSD et capables de produire des VLDL, nous avons analysé l'association des particules virales infectieuses sécrétées avec les lipoprotéines de l'hôte. Nous avons observé une association préférentielle de l'ARN viral avec apoE, et une association faible ou inexistante avec apoB, suggérant une absence d'association du virus avec les VLDL, mais plutôt un détournement de la voie de synthèse des VLDL vers la sécrétion de particules virales hybrides, positives pour apoE mais pas pour apoB. Ces résultats confortent ceux obtenus jusqu'à présent en cellules Huh7 et dérivées, mais soulignent également l'importance de travailler avec des lignées cellulaires possédant un métabolisme gluco-lipidique plus physiologique, comme par exemple la lignée HepaRG.



## Références bibliographiques

### A

- Abe, K., Ikeda, M., Ariumi, Y., Dansako, H., and Kato, N. (2007). Serum-free cell culture system supplemented with lipid-rich albumin for hepatitis C virus (strain O of genotype 1b) replication. *Virus Res* 125, 162–168.
- Abid, K., Pazienza, V., de Gottardi, A., Rubbia-Brandt, L., Conne, B., Pugnale, P., Rossi, C., Mangia, A., and Negro, F. (2005). An in vitro model of hepatitis C virus genotype 3a-associated triglycerides accumulation. *J Hepatol* 42, 744–751.
- Adams, D.H., and Eksteen, B. (2006). Aberrant homing of mucosal T cells and extra-intestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 6, 244–251.
- 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.
- Agnello, V., and De Rosa, F.G. (2004). Extrahepatic disease manifestations of HCV infection: some current issues. *J Hepatol* 40, 341–352.
- Ai, L.-S., Lee, Y.-W., and Chen, S.S.-L. (2009). Characterization of hepatitis C virus core protein multimerization and membrane envelopment: revelation of a cascade of core-membrane interactions. *J Virol* 83, 9923–9939.
- Ait-Goughoulte, M., Hourieux, C., Patient, R., Trassard, S., Brand, D., and Roingeard, P. (2006). Core protein cleavage by signal peptide peptidase is required for hepatitis C virus-like particle assembly. *J Gen Virol* 87, 855–860.
- Ait-Goughoulte, M., Kanda, T., Meyer, K., Ryerse, J.S., Ray, R.B., and Ray, R. (2008). Hepatitis C virus genotype 1a growth and induction of autophagy. *J Virol* 82, 2241–2249.
- Akazawa, D., Morikawa, K., Omi, N., Takahashi, H., Nakamura, N., Mochizuki, H., Date, T., Ishii, K., Suzuki, T., and Wakita, T. (2011). Production and characterization of HCV particles from serum-free culture. *Vaccine* 29, 4821–4828.
- Ali, N., Pruijn, G.J., Kenan, D.J., Keene, J.D., and Siddiqui, A. (2000). Human La antigen is required for the hepatitis C virus internal ribosome entry site-mediated translation. *J Biol Chem* 275, 27531–27540.
- Ali, N., and Siddiqui, A. (1995). Interaction of polypyrimidine tract-binding protein with the 5' noncoding region of the hepatitis C virus RNA genome and its functional requirement in internal initiation of translation. *J Virol* 69, 6367–6375.
- Ali, N., and Siddiqui, A. (1997). The La antigen binds 5' noncoding region of the hepatitis C virus RNA in the context of the initiator AUG codon and stimulates internal ribosome entry site-mediated translation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 2249–2254.
- Alter, H.J., and Shih, J.W. (1993). Probable visualization of the elusive hepatitis C virus. *Hepatology* 17, 1164–1166.
- Alter, M.J. (1997). Epidemiology of hepatitis C. *Hepatology* 26, 62S–65S.
- Alter, M.J. (2007). Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol* 13, 2436–2441.
- Aly, H.H., Qi, Y., Atsuzawa, K., Usuda, N., Takada, Y., Mizokami, M., Shimotohno, K., and Hijikata, M. (2009). Strain-dependent viral dynamics and virus-cell interactions in a novel in vitro system supporting the life cycle of blood-borne hepatitis C virus. *Hepatology* 50, 689–696.
- Amadei, B., Urbani, S., Cazaly, A., Fiscaro, P., Zerbini, A., Ahmed, P., Missale, G., Ferrari, C., and Khakoo, S.I. (2010). Activation of natural killer cells during acute infection with hepatitis C virus. *Gastroenterology* 138, 1536–1545.
- Amako, Y., Syed, G.H., and Siddiqui, A. (2011). Protein kinase D negatively regulates hepatitis C virus secretion through phosphorylation of oxysterol-binding protein and ceramide transfer protein. *J Biol Chem* 286, 11265–11274.
- 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.

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

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

Angelico, F., Francioso, S., Del Ben, M., Feole, K., Carbone, M., Pignatelli, P., Violi, F., and Angelico, M. (2009). Clinical trial: low plasma cholesterol and oxidative stress predict rapid virological response to standard therapy with peginterferon and ribavirin in HCV patients. *Aliment Pharmacol Ther* 30, 444–451.

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.

Ariumi, Y., Kuroki, M., Maki, M., Ikeda, M., Dansako, H., Wakita, T., and Kato, N. (2011). The ESCRT System Is Required for Hepatitis C Virus Production. *PLoS ONE* 6, e14517.

Asselah, T., Bièche, I., Mansouri, A., Laurendeau, I., Cazals-Hatem, D., Feldmann, G., Bedossa, P., Paradis, V., Martinot-Peignoux, M., Lebrech, D., et al. (2010). In vivo hepatic endoplasmic reticulum stress in patients with chronic hepatitis C. *J Pathol* 221, 264–274.

Asselah, T., Rubbia-Brandt, L., Marcellin, P., and Negro, F. (2006). Steatosis in chronic hepatitis C: why does it really matter? *Gut* 55, 123–130.

Azuma, H., Paulk, N., Ranade, A., Dorrell, C., Al-Dhalimy, M., Ellis, E., Strom, S., Kay, M.A., Finegold, M., and Grompe, M. (2007). Robust expansion of human hepatocytes in Fah<sup>-/-</sup>/Rag2<sup>-/-</sup>/Il2rg<sup>-/-</sup> mice. *Nat Biotechnol* 25, 903–910.

## B

Backes, P., Quinkert, D., Reiss, S., Binder, M., Zayas, M., Rescher, U., Gerke, V., Bartenschlager, R., and Lohmann, V. (2010). Role of annexin A2 in the production of infectious hepatitis C virus particles. *J Virol* 84, 5775–5789.

Banaudha, K., Orenstein, J.M., Korolnek, T., St Laurent, G.C., Wakita, T., and Kumar, A. (2010). Primary hepatocyte culture supports hepatitis C virus replication: a model for infection-associated hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 51, 1922–1932.

Banerjee, S., Saito, K., Ait-Goughoulte, M., Meyer, K., Ray, R.B., and Ray, R. (2008). Hepatitis C virus core protein upregulates serine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 and impairs the downstream akt/protein kinase B signaling pathway for insulin resistance. *J Virol* 82, 2606–2612.

Barrila, J., Radtke, A.L., Crabbé, A., Sarker, S.F., Herbst-Kralovetz, M.M., Ott, C.M., and Nickerson, C.A. (2010). Organotypic 3D cell culture models: using the rotating wall vessel to study host-pathogen interactions. *Nat Rev Microbiol* 8, 791–801.

Bartenschlager, R., Penin, F., Lohmann, V., and André, P. (2011). Assembly of infectious hepatitis C virus particles. *Trends Microbiol* 19, 95–103.

Barth, H., Rybczynska, J., Patient, R., Choi, Y., Sapp, R.K., Baumert, T.F., Krawczynski, K., and Liang, T.J. (2011). Both innate and adaptive immunity mediate protective immunity against hepatitis C virus infection in chimpanzees. *Hepatology* 54, 1135–1148.

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.

Bartosch, B., Thimme, R., Blum, H.E., and Zoulim, F. (2009). Hepatitis C virus-induced hepatocarcinogenesis. *J Hepatol* 51, 810–820.

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

- Bassendine, M.F., Sheridan, D.A., Felmlee, D.J., Bridge, S.H., Toms, G.L., and Neely, R.D.G. (2011). HCV and the hepatic lipid pathway as a potential treatment target. *J Hepatol* 55, 1428–1440.
- Bassett, S.E., Brasky, K.M., and Lanford, R.E. (1998). Analysis of hepatitis C virus-inoculated chimpanzees reveals unexpected clinical profiles. *J Virol* 72, 2589–2599.
- Benedicto, I., Molina-Jiménez, F., Bartosch, B., Cosset, F.-L., Lavillette, D., Prieto, J., Moreno-Otero, R., Valenzuela-Fernández, A., Aldabe, R., López-Cabrera, M., et al. (2009). The tight junction-associated protein occludin is required for a postbinding step in hepatitis C virus entry and infection. *J Virol* 83, 8012–8020.
- Benga, W.J.A., 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.
- Beran, R.K.F., and Pyle, A.M. (2008). Hepatitis C viral NS3-4A protease activity is enhanced by the NS3 helicase. *J Biol Chem* 283, 29929–29937.
- 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.
- Bickel, P.E., Tansey, J.T., and Welte, M.A. (2009). PAT proteins, an ancient family of lipid droplet proteins that regulate cellular lipid stores. *Biochim Biophys Acta* 1791, 419–440.
- Di Bisceglie, A.M. (2000). Natural history of hepatitis C: its impact on clinical management. *Hepatology* 31, 1014–1018.
- 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.
- Bitzegeio, J., Bankwitz, D., Hueging, K., Haid, S., Brohm, C., Zeisel, M.B., Herrmann, E., Iken, M., Ott, M., Baumert, T.F., et al. (2010). Adaptation of hepatitis C virus to mouse CD81 permits infection of mouse cells in the absence of human entry factors. *PLoS Pathog* 6, e1000978.
- Blackard, J.T., Kemmer, N., and Sherman, K.E. (2006). Extrahepatic replication of HCV: insights into clinical manifestations and biological consequences. *Hepatology* 44, 15–22.
- Blanchard, E., Belouzard, S., Goueslain, L., Wakita, T., Dubuisson, J., Wychowski, C., and Rouillé, Y. (2006). Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J Virol* 80, 6964–6972.
- Blanchard, E., Hourieux, C., Brand, D., Ait-Goughoulte, M., Moreau, A., Trassard, S., Sizaret, P.-Y., Dubois, F., and Roingeard, P. (2003). Hepatitis C virus-like particle budding: role of the core protein and importance of its Asp111. *J Virol* 77, 10131–10138.
- Blasiole, D.A., Davis, R.A., and Attie, A.D. (2007). The physiological and molecular regulation of lipoprotein assembly and secretion. *Mol Biosyst* 3, 608–619.
- Blight, K.J., Kolykhalov, A.A., and Rice, C.M. (2000). Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science* 290, 1972–1974.
- 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.
- Bode, J.G., Ludwig, S., Ehrhardt, C., Albrecht, U., Erhardt, A., Schaper, F., Heinrich, P.C., and Häussinger, D. (2003). IFN-alpha antagonistic activity of HCV core protein involves induction of suppressor of cytokine signaling-3. *Faseb J* 17, 488–490.
- Boden, G. (2008). Carbohydrates and the liver. In *Textbook of Hepatology: From Basic Science to Clinical Practice*, J. Rodés, J.-P. Benhamou, A.T. Blei, J. Reichen, and M. Rizzetto, eds. (Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd), pp. 129–133.
- Boehringer, D., Thermann, R., Ostareck-Lederer, A., Lewis, J.D., and Stark, H. (2005). Structure of the hepatitis C virus IRES bound to the human 80S ribosome: remodeling of the HCV IRES. *Structure* 13, 1695–1706.
- Bonander, N., Jamshad, M., Hu, K., Farquhar, M.J., Stamatakis, Z., Balfe, P., McKeating, J.A., and Bill, R.M. (2011). Structural characterization of CD81-Claudin-1 hepatitis C virus receptor complexes. *Biochem Soc Trans* 39, 537–540.

Bonnafous, P., Perrault, M., Le Bihan, O., Bartosch, B., Lavillette, D., Penin, F., Lambert, O., and Pécheur, E.-I. (2010). Characterization of hepatitis C virus pseudoparticles by cryo-transmission electron microscopy using functionalized magnetic nanobeads. *J Gen Virol* *91*, 1919–1930.

Borén, J., Rustaeus, S., and Olofsson, S.O. (1994). Studies on the assembly of apolipoprotein B-100- and B-48-containing very low density lipoproteins in McA-RH7777 cells. *J Biol Chem* *269*, 25879–25888.

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.

Boucheix, C., and Rubinstein, E. (2001). Tetraspanins. *Cell Mol Life Sci* *58*, 1189–1205.

Boulant, S., Becchi, M., Penin, F., and Lavergne, J.-P. (2003). Unusual multiple recoding events leading to alternative forms of hepatitis C virus core protein from genotype 1b. *J Biol Chem* *278*, 45785–45792.

Boulant, S., Douglas, M.W., Moody, L., Budkowska, A., Targett-Adams, P., and McLauchlan, J. (2008). Hepatitis C virus core protein induces lipid droplet redistribution in a microtubule- and dynein-dependent manner. *Traffic* *9*, 1268–1282.

Boulant, S., Montserret, R., Hope, R.G., Ratiner, M., Targett-Adams, P., Lavergne, J.-P., Penin, F., and McLauchlan, J. (2006). Structural determinants that target the hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *J Biol Chem* *281*, 22236–22247.

Boulant, S., Targett-Adams, P., and McLauchlan, J. (2007). Disrupting the association of hepatitis C virus core protein with lipid droplets correlates with a loss in production of infectious virus. *J Gen Virol* *88*, 2204–2213.

Bowen, D.G., and Walker, C.M. (2005). Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection. *Nature* *436*, 946–952.

Braiterman, L.T., and Hubbard, A.L. (2009). Hepatocyte Surface Polarity: Its Dynamic Maintenance and Establishment. In *The Liver: Biology and Pathobiology*, I.M. Arias, ed. (Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd), pp. 73–105.

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.

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.

Brohm, C., Steinmann, E., Friesland, M., Lorenz, I.C., Patel, A., Penin, F., Bartenschlager, R., and Pietschmann, T. (2009). Characterization of determinants important for hepatitis C virus p7 function in morphogenesis by using trans-complementation. *J Virol* *83*, 11682–11693.

Buck, M. (2008). Direct infection and replication of naturally occurring hepatitis C virus genotypes 1, 2, 3 and 4 in normal human hepatocyte cultures. *PLoS ONE* *3*, e2660.

Bugianesi, E., Salamone, F., and Negro, F. (2012). The interaction of metabolic factors with HCV infection: Does it matter? *J Hepatol* *56 Suppl*, S56–65.

Bukh, J. (2004). A critical role for the chimpanzee model in the study of hepatitis C. *Hepatology* *39*, 1469–1475.

Bukh, J., Purcell, R.H., and Miller, R.H. (1992). Sequence analysis of the 5' noncoding region of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* *89*, 4942–4946.

Bukh, J., Purcell, R.H., and Miller, R.H. (1993). At least 12 genotypes of hepatitis C virus predicted by sequence analysis of the putative E1 gene of isolates collected worldwide. *Proc Natl Acad Sci U S A* *90*, 8234–8238.

Bukh, J., Purcell, R.H., and Miller, R.H. (1994). Sequence analysis of the core gene of 14 hepatitis C virus genotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 8239–8243.

Buratti, E., Tisminetzky, S., Zotti, M., and Baralle, F.E. (1998). Functional analysis of the interaction between HCV 5'UTR and putative subunits of eukaryotic translation initiation factor eIF3. *Nucleic Acids Res* *26*, 3179–3187.

## C

- Carmeliet, P., and Jain, R.K. (2011). Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* *473*, 298–307.
- 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.
- Cerutti, A., Maillard, P., Minisini, R., Vidalain, P.-O., Roohvand, F., Pecheur, E.-I., Pirisi, M., and Budkowska, A. (2011). Identification of a functional, CRM-1-dependent nuclear export signal in hepatitis C virus core protein. *PLoS ONE* *6*, e25854.
- Chan, S.-W., and Egan, P.A. (2005). Hepatitis C virus envelope proteins regulate CHOP via induction of the unfolded protein response. *Faseb J* *19*, 1510–1512.
- Chang, K.-O., and George, D.W. (2007). Bile acids promote the expression of hepatitis C virus in replicon-harboring cells. *J Virol* *81*, 9633–9640.
- 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.
- Charrin, S., le Naour, F., Silvie, O., Milhiet, P.-E., Boucheix, C., and Rubinstein, E. (2009). Lateral organization of membrane proteins: tetraspanins spin their web. *Biochem J* *420*, 133–154.
- Chatel-Chaix, L., Melançon, P., Racine, M.-È., Baril, M., and Lamarre, D. (2011). Y-box-binding protein 1 interacts with hepatitis C virus NS3/4A and influences the equilibrium between viral RNA replication and infectious particle production. *J Virol* *85*, 11022–11037.
- Chen, S.L., and Morgan, T.R. (2006). The natural history of hepatitis C virus (HCV) infection. *Int J Med Sci* *3*, 47–52.
- Chen, Y.-J., Chen, Y.-H., Chow, L.-P., Tsai, Y.-H., Chen, P.-H., Huang, C.-Y.F., Chen, W.-T., and Hwang, L.-H. (2010). Heat shock protein 72 is associated with the hepatitis C virus replicase complex and enhances viral RNA replication. *J Biol Chem* *285*, 28183–28190.
- Choi, J., and Ou, J.-H.J. (2006). Mechanisms of liver injury. III. Oxidative stress in the pathogenesis of hepatitis C virus. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* *290*, G847–851.
- 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.
- Choo, Q.L., Richman, K.H., Han, J.H., Berger, K., Lee, C., Dong, C., Gallegos, C., Coit, D., Medina-Selby, R., and Barr, P.J. (1991). Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* *88*, 2451–2455.
- Chowdhury, N.R., and Chowdhury, J.R. (2009). Disorders of Bilirubin Metabolism. In *The Liver: Biology and Pathobiology*, I.M. Arias, ed. (Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd), pp. 251–256.
- Chu, V.C., Bhattacharya, S., Nomoto, A., Lin, J., Zaidi, S.K., Oberley, T.D., Weinman, S.A., Azhar, S., and Huang, T.-T. (2011). Persistent expression of hepatitis C virus non-structural proteins leads to increased autophagy and mitochondrial injury in human hepatoma cells. *PLoS ONE* *6*, e28551.
- Ciesek, S., Steinmann, E., Wedemeyer, H., Manns, M.P., Neyts, J., Tautz, N., Madan, V., Bartenschlager, R., von Hahn, T., and Pietschmann, T. (2009). Cyclosporine A inhibits hepatitis C virus nonstructural protein 2 through cyclophilin A. *Hepatology* *50*, 1638–1645.
- Clément, S., Peyrou, M., Sanchez-Pareja, A., Bourgoin, L., Ramadori, P., Suter, D., Vinciguerra, M., Guilloux, K., Pascarella, S., Rubbia-Brandt, L., et al. (2011). Down-regulation of phosphatase and tensin homolog by hepatitis C virus core 3a in hepatocytes triggers the formation of large lipid droplets. *Hepatology* *54*, 38–49.
- 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.
- Cohen, D.E. (2009). Lipoprotein Metabolism and Cholesterol Balance. In *The Liver: Biology and Pathobiology*, I.M. Arias, ed. (Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd), pp. 271–285.
- Coller, K.E., Heaton, N.S., Berger, K.L., Cooper, J.D., Saunders, J.L., and Randall, G. (2012). Molecular determinants and dynamics of hepatitis C virus secretion. *PLoS Pathog* *8*, e1002466.

Corless, L., Crump, C.M., Griffin, S.D.C., and Harris, M. (2010). Vps4 and the ESCRT-III complex are required for the release of infectious hepatitis C virus particles. *J Gen Virol* 91, 362–372.

Counihan, N.A., Rawlinson, S.M., and Lindenbach, B.D. (2011). Trafficking of Hepatitis C Virus Core Protein during Virus Particle Assembly. *PLoS Pathog* 7, e1002302.

Coyne, C.B., and Bergelson, J.M. (2006). Virus-induced Abl and Fyn kinase signals permit coxsackievirus entry through epithelial tight junctions. *Cell* 124, 119–131.

Crispe, I.N. (2009). The liver as a lymphoid organ. *Annu Rev Immunol* 27, 147–163.

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

## D

Dahl, G., Sandström, A., Akerblom, E., and Danielson, U.H. (2007). Effects on protease inhibition by modifying of helicase residues in hepatitis C virus nonstructural protein 3. *Febs J* 274, 5979–5986.

Dash, S., Halim, A.B., Tsuji, H., Hiramatsu, N., and Gerber, M.A. (1997). Transfection of HepG2 cells with infectious hepatitis C virus genome. *Am J Pathol* 151, 363–373.

Date, T., Kato, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., Yasui, K., Mizokami, M., and Wakita, T. (2004). Genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon can replicate in HepG2 and IMY-N9 cells. *J Biol Chem* 279, 22371–22376.

Dawson, P.A., Lan, T., and Rao, A. (2009). Bile acid transporters. *J Lipid Res* 50, 2340–2357.

Deforges, S., Evlashev, A., Perret, M., Sodoyer, M., Pouzol, S., Scoazec, J.-Y., Bonnaud, B., Diaz, O., Paranhos-Baccalà, G., Lotteau, V., et al. (2004). Expression of hepatitis C virus proteins in epithelial intestinal cells in vivo. *J Gen Virol* 85, 2515–2523.

Delgrange, D., Pillez, A., Castelain, S., Cocquerel, L., Rouillé, Y., Dubuisson, J., Wakita, T., Duverlie, G., and Wychowski, C. (2007). Robust production of infectious viral particles in Huh-7 cells by introducing mutations in hepatitis C virus structural proteins. *J Gen Virol* 88, 2495–2503.

Deng, L., Shoji, I., Ogawa, W., Kaneda, S., Soga, T., Jiang, D., Ide, Y.-H., and Hotta, H. (2011). Hepatitis C virus infection promotes hepatic gluconeogenesis through an NS5A-mediated, FoxO1-dependent pathway. *J Virol* 85, 8556–8568.

Depla, M., Uzbekov, R., Hourieux, C., Blanchard, E., Le Gouge, A., Gillet, L., and Roingeard, P. (2010). Ultrastructural and quantitative analysis of the lipid droplet clustering induced by hepatitis C virus core protein. *Cell Mol Life Sci* 67, 3151–3161.

Dharancy, S., Malapel, M., Perlemuter, G., Roskams, T., Cheng, Y., Dubuquoy, L., Podevin, P., Conti, F., Canva, V., Philippe, D., et al. (2005). Impaired expression of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha during hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 128, 334–342.

Diamond, D.L., Krasnoselsky, A.L., Burnum, K.E., Monroe, M.E., Webb-Robertson, B.-J., McDermott, J.E., Yeh, M.M., Dzib, J.F.G., Susnow, N., Strom, S., et al. (2012). Proteome and computational analyses reveal new insights into the mechanisms of hepatitis C virus-mediated liver disease posttransplantation. *Hepatology*.

Diaz, O., Delers, F., Maynard, M., Demignot, S., Zoulim, F., Chambaz, J., Trépo, C., Lotteau, V., and André, P. (2006). Preferential association of Hepatitis C virus with apolipoprotein B48-containing lipoproteins. *J Gen Virol* 87, 2983–2991.

Diegelmann, J., Beigel, F., Zitzmann, K., Kaul, A., Göke, B., Auernhammer, C.J., Bartenschlager, R., Diepolder, H.M., and Brand, S. (2010). Comparative analysis of the lambda-interferons IL-28A and IL-29 regarding their transcriptome and their antiviral properties against hepatitis C virus. *PLoS ONE* 5, e15200.

Dionisio, N., Garcia-Mediavilla, M.V., Sanchez-Campos, S., Majano, P.L., Benedicto, I., Rosado, J.A., Salido, G.M., and Gonzalez-Gallego, J. (2009). Hepatitis C virus NS5A and core proteins induce oxidative stress-mediated calcium signalling alterations in hepatocytes. *J Hepatol* 50, 872–882.

Dixon, J.L., and Ginsberg, H.N. (1993). Regulation of hepatic secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins: information obtained from cultured liver cells. *J Lipid Res* 34, 167–179.

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.

Dreux, M., and Chisari, F.V. (2010). Viruses and the autophagy machinery. *Cell Cycle* 9, 1295–1307.

Dreux, M., Gastaminza, P., Wieland, S.F., and Chisari, F.V. (2009a). The autophagy machinery is required to initiate hepatitis C virus replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 14046–14051.

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.

Dreux, M., Dao Thi, V.L., Fresquet, J., Guérin, M., Julia, Z., Verney, G., Durantel, D., Zoulim, F., Lavillette, D., Cosset, F.-L., et al. (2009b). 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.

Dufour, J. (2008). Biliary Epithelial Cells. In *Textbook of Hepatology: From Basic Science to Clinical Practice*, J. Rodés, J.-P. Benhamou, A.T. Blei, J. Reichen, and M. Rizzetto, eds. (Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd), pp. 52–57.

Duong, F.H.T., Filipowicz, M., Tripodi, M., La Monica, N., and Heim, M.H. (2004). Hepatitis C virus inhibits interferon signaling through up-regulation of protein phosphatase 2A. *Gastroenterology* *126*, 263–277.

## E

Egger, D., Wölk, B., Gosert, R., Bianchi, L., Blum, H.E., Moradpour, D., and Bienz, K. (2002). Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol* *76*, 5974–5984.

el-Awady, M.K., Tabll, A.A., el-Abd, Y.S., Bahgat, M.M., Shoeb, H.A., Youssef, S.S., Bader el-Din, N.G., Redwan, el-R.M., el-Demellawy, M., Omran, M.H., et al. (2006). HepG2 cells support viral replication and gene expression of hepatitis C virus genotype 4 in vitro. *World J Gastroenterol* *12*, 4836–4842.

Esteban, J.I., Sauleda, S., and Quer, J. (2008). The changing epidemiology of hepatitis C virus infection in Europe. *J Hepatol* *48*, 148–162.

Estrabaud, E., De Muyenck, S., and Asselah, T. (2011). Activation of unfolded protein response and autophagy during HCV infection modulates innate immune response. *J Hepatol* *55*, 1150–1153.

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.

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.

## F

Farquhar, M.J., Harris, H.J., and McKeating, J.A. (2011). Hepatitis C virus entry and the tetraspanin CD81. *Biochem Soc Trans* *39*, 532–536.

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*.

Fartoux, L., Poujol-Robert, A., Guéchet, J., Wendum, D., Poupon, R., and Serfaty, L. (2005). Insulin resistance is a cause of steatosis and fibrosis progression in chronic hepatitis C. *Gut* *54*, 1003–1008.

Feld, J.J., and Hoofnagle, J.H. (2005). Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. *Nature* *436*, 967–972.

Felmlee, D.J., Sheridan, D.A., Bridge, S.H., Nielsen, S.U., Milne, R.W., Packard, C.J., Caslake, M.J., McLauchlan, J., Toms, G.L., Neely, R.D.G., et al. (2010). Intravascular transfer contributes to postprandial increase in numbers of very-low-density hepatitis C virus particles. *Gastroenterology* *139*, 1774–1783, 1783.e1–6.

Ferraris, P., Blanchard, E., and Roingeard, P. (2010). Ultrastructural and biochemical analyses of hepatitis C virus-associated host cell membranes. *J Gen Virol* *91*, 2230–2237.

Fidge, N.H. (1999). High density lipoprotein receptors, binding proteins, and ligands. *J Lipid Res* *40*, 187–201.

Fischer, R., Baumert, T., and Blum, H.-E. (2007). Hepatitis C virus infection and apoptosis. *World J Gastroenterol* *13*, 4865–4872.

Fisher, E.A., Khanna, N.A., and McLeod, R.S. (2011). Ubiquitination regulates the assembly of VLDL in HepG2 cells and is the committing step of the apoB-100 ERAD pathway. *J Lipid Res* *52*, 1170–1180.

- Fletcher, N.F., Wilson, G.K., Murray, J., Hu, K., Lewis, A., Reynolds, G.M., Stamatakis, Z., Meredith, L.W., Rowe, I.A., Luo, G., et al. (2012). Hepatitis C virus infects the endothelial cells of the blood-brain barrier. *Gastroenterology* *142*, 634–643.e6.
- Fletcher, N.F., Yang, J.P., Farquhar, M.J., Hu, K., Davis, C., He, Q., Dowd, K., Ray, S.C., Krieger, S.E., Neyts, J., et al. (2010). Hepatitis C virus infection of neuroepithelioma cell lines. *Gastroenterology* *139*, 1365–1374.
- Fraser, C.S., and Doudna, J.A. (2007). Structural and mechanistic insights into hepatitis C viral translation initiation. *Nat Rev Microbiol* *5*, 29–38.
- 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., Boudet, J., Simorre, J.-P., and Bartenschlager, R. (2005). Kissing-loop interaction in the 3' end of the hepatitis C virus genome essential for RNA replication. *J Virol* *79*, 380–392.
- 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., Gonçalves, F.L., Jr, Häussinger, 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.
- Fukuhara, T., Tani, H., Shiokawa, M., Goto, Y., Abe, T., Taketomi, A., Shirabe, K., Maehara, Y., and Matsuura, Y. (2011). Intracellular delivery of serum-derived hepatitis C virus. *Microbes Infect* *13*, 405–412.

## G

- Galbraith, R.A., Sassa, S., and Fujita, H. (1988). Regulation of heme synthesis in HepG2 human hepatoma cells by dimethyl sulfoxide. *Biochem Biophys Res Commun* *153*, 869–874.
- Gale, M., Jr, Blakely, C.M., Kwieciszewski, B., Tan, S.L., Dossett, M., Tang, N.M., Korth, M.J., Polyak, S.J., Gretch, D.R., and Katze, M.G. (1998). Control of PKR protein kinase by hepatitis C virus nonstructural 5A protein: molecular mechanisms of kinase regulation. *Mol Cell Biol* *18*, 5208–5218.
- Gale, M., Jr, and Foy, E.M. (2005). Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus. *Nature* *436*, 939–945.
- Gane, E.J. (2008). The natural history of recurrent hepatitis C and what influences this. *Liver Transpl* *14 Suppl 2*, S36–44.
- Gao, L., Aizaki, H., He, J.-W., and Lai, M.M.C. (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.
- Garaigorta, U., and Chisari, F.V. (2009). Hepatitis C virus blocks interferon effector function by inducing protein kinase R phosphorylation. *Cell Host Microbe* *6*, 513–522.
- 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.
- Gastaminza, P., Dryden, K.A., Boyd, B., Wood, M.R., Law, M., Yeager, M., and Chisari, F.V. (2010). Ultrastructural and biophysical characterization of hepatitis C virus particles produced in cell culture. *J Virol* *84*, 10999–11009.
- Ge, D., Fellay, J., Thompson, A.J., Simon, J.S., Shianna, K.V., Urban, T.J., Heinzen, E.L., Qiu, P., Bertelsen, A.H., Muir, A.J., et al. (2009). Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* *461*, 399–401.
- Gedaly, R., Angulo, P., Hundley, J., Daily, M.F., Chen, C., Koch, A., and Evers, B.M. (2010). PI-103 and sorafenib inhibit hepatocellular carcinoma cell proliferation by blocking Ras/Raf/MAPK and PI3K/AKT/mTOR pathways. *Anticancer Res.* *30*, 4951–4958.
- Ghany, M.G., Strader, D.B., Thomas, D.L., and Seeff, L.B. (2009). Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. *Hepatology* *49*, 1335–1374.
- Giehl, K., Skripczynski, B., Mansard, A., Menke, A., and Gierschik, P. (2000). Growth factor-dependent activation of the Ras-Raf-MEK-MAPK pathway in the human pancreatic carcinoma cell line PANC-1 carrying activated K-ras: implications for cell proliferation and cell migration. *Oncogene* *19*, 2930–2942.

- Girard, M., Jacquemin, E., Munnich, A., Lyonnet, S., and Henrion-Caude, A. (2008). miR-122, a paradigm for the role of microRNAs in the liver. *J Hepatol* 48, 648–656.
- Goffard, A., Callens, N., Bartosch, B., Wychowski, C., Cosset, F.-L., Montpellier, C., and Dubuisson, J. (2005). Role of N-linked glycans in the functions of hepatitis C virus envelope glycoproteins. *J Virol* 79, 8400–8409.
- Gorzin, A.A., Ramsland, P.A., Tachedjian, G., and Gowans, E.J. (2012). Identification of residues involved in NS2 homodimerization and elucidation of their impact on the HCV life cycle. *J Viral Hepat* 19, 189–198.
- 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.
- 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 NS5B is involved in virus morphogenesis. *J Virol*.
- Gouttenoire, J., Penin, F., and Moradpour, D. (2010). Hepatitis C virus nonstructural protein 4B: a journey into unexplored territory. *Rev Med Virol* 20, 117–129.
- Grakoui, A., McCourt, D.W., Wychowski, C., Feinstone, S.M., and Rice, C.M. (1993). A second hepatitis C virus-encoded proteinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 10583–10587.
- Griffin, S.D.C., Beales, L.P., Clarke, D.S., Worsfold, O., Evans, S.D., Jaeger, J., Harris, M.P.G., and Rowlands, D.J. (2003). The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS Lett* 535, 34–38.
- Grisham, J.W. (2009). Organizational Principles of the Liver. In *The Liver: Biology and Pathobiology*, I.M. Arias, ed. (Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd), pp. 1–15.
- Guévin, C., Manna, D., Bélanger, C., Konan, K.V., Mak, P., and Labonté, P. (2010). Autophagy protein ATG5 interacts transiently with the hepatitis C virus RNA polymerase (NS5B) early during infection. *Virology* 405, 1–7.
- Guguen-Guillouzo, C., and Guillouzo, A. (2010). General review on in vitro hepatocyte models and their applications. *Methods Mol Biol* 640, 1–40.
- Le Guillou-Guillemette, H., Vallet, S., Gaudy-Graffin, C., Payan, C., Pivert, A., Goudeau, A., and Lunel-Fabiani, F. (2007). Genetic diversity of the hepatitis C virus: impact and issues in the antiviral therapy. *World J Gastroenterol* 13, 2416–2426.

## H

- 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., Yoon, J.C., Alter, H., Rice, C.M., Rehermann, 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.
- Haid, S., Pietschmann, T., and Pécheur, 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.
- Hamamoto, I., Nishimura, Y., Okamoto, T., Aizaki, H., Liu, M., Mori, Y., Abe, T., Suzuki, T., Lai, M.M.C., Miyamura, T., et al. (2005). Human VAP-B is involved in hepatitis C virus replication through interaction with NS5A and NS5B. *J Virol* 79, 13473–13482.
- Harris, C., Herker, E., Farese, R.V., Jr, and Ott, M. (2011). Hepatitis C virus core protein decreases lipid droplet turnover: a mechanism for core-induced steatosis. *J Biol Chem* 286, 42615–42625.
- Harris, H.J., Davis, C., Mullins, J.G.L., 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.
- Helle, F., Vieyres, G., Elkrief, L., Popescu, C.-I., Wychowski, C., Descamps, V., Castelain, S., Roingeard, P., Duverlie, G., and Dubuisson, J. (2010). Role of N-linked glycans in the functions of hepatitis C virus envelope proteins incorporated into infectious virions. *J Virol* 84, 11905–11915.
- Henke, J.I., Goergen, D., Zheng, J., Song, Y., Schüttler, C.G., Fehr, C., Jünemann, C., and Niepmann, M. (2008). microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *Embo J* 27, 3300–3310.

Herker, E., Harris, C., Hernandez, C., Carpentier, A., Kaehlcke, K., Rosenberg, A.R., Farese, R.V., Jr, and Ott, M. (2010). Efficient hepatitis C virus particle formation requires diacylglycerol acyltransferase-1. *Nat Med* 16, 1295–1298.

Herker, E., and Ott, M. (2011). Unique ties between hepatitis C virus replication and intracellular lipids. *Trends Endocrinol Metab* 22, 241–248.

Hijikata, M., Shimizu, Y.K., Kato, H., Iwamoto, A., Shih, J.W., Alter, H.J., Purcell, R.H., and Yoshikura, H. (1993). Equilibrium centrifugation studies of hepatitis C virus: evidence for circulating immune complexes. *J Virol* 67, 1953–1958.

Hikosaka, K., Noritake, H., Kimura, W., Sultana, N., Sharkar, M.T.K., Tagawa, Y.-I., Uezato, T., Kobayashi, Y., Wakita, T., and Miura, N. (2011). Expression of human factors CD81, claudin-1, scavenger receptor, and occludin in mouse hepatocytes does not confer susceptibility to HCV entry. *Biomed Res* 32, 143–150.

Hino, K., Sainokami, S., Shimoda, K., Niwa, H., and Iino, S. (1994). Clinical course of acute hepatitis C and changes in HCV markers. *Dig Dis Sci* 39, 19–27.

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.

Hnatyszyn, H.J. (2005). Chronic hepatitis C and genotyping: the clinical significance of determining HCV genotypes. *Antivir Ther (Lond)* 10, 1–11.

Hope, R.G., and McLauchlan, J. (2000). Sequence motifs required for lipid droplet association and protein stability are unique to the hepatitis C virus core protein. *J Gen Virol* 81, 1913–1925.

Hourioux, C., Patient, R., Morin, A., Blanchard, E., Moreau, A., Trassard, S., Giraudeau, B., and Roingeard, P. (2007). The genotype 3-specific hepatitis C virus core protein residue phenylalanine 164 increases steatosis in an in vitro cellular model. *Gut* 56, 1302–1308.

Høyer-Hansen, M., and Jäättelä, M. (2007). Connecting endoplasmic reticulum stress to autophagy by unfolded protein response and calcium. *Cell Death Differ* 14, 1576–1582.

Huang, H., Sun, F., Owen, D.M., Li, W., Chen, Y., Gale, M., 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.

Hughes, M., Gretton, S., Shelton, H., Brown, D.D., McCormick, C.J., Angus, A.G.N., Patel, A.H., Griffin, S., and Harris, M. (2009a). A conserved proline between domains II and III of hepatitis C virus NS5A influences both RNA replication and virus assembly. *J Virol* 83, 10788–10796.

Hughes, M., Griffin, S., and Harris, M. (2009b). Domain III of NS5A contributes to both RNA replication and assembly of hepatitis C virus particles. *J Gen Virol* 90, 1329–1334.

## I

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

Van IJzendoorn, S.C.D., Van Der Wouden, J.M., Liebisch, G., Schmitz, G., and Hoekstra, D. (2004). Polarized membrane traffic and cell polarity development is dependent on dihydroceramide synthase-regulated sphinganine turnover. *Mol Biol Cell* 15, 4115–4124.

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

## J

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

Jackel-Cram, C., Qiao, L., Xiang, Z., Brownlie, R., Zhou, Y., Babiuk, L., and Liu, Q. (2010). Hepatitis C virus genotype-3a core protein enhances sterol regulatory element-binding protein-1 activity through the phosphoinositide 3-kinase-Akt-2 pathway. *J Gen Virol* 91, 1388–1395.

Jaeschke, H. (2008). Kupffer Cells. In *Textbook of Hepatology: From Basic Science to Clinical Practice*, J. Rodés, J.-P. Benhamou, A.T. Blei, J. Reichen, and M. Rizzetto, eds. (Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd), pp. 36–42.

Jangra, R.K., Yi, M., and Lemon, S.M. (2010). Regulation of hepatitis C virus translation and infectious virus production by the microRNA miR-122. *J Virol* *84*, 6615–6625.

Jansen, P.L.M., and Faber, K.N. (2008). Metabolism of bile acids. In *Textbook of Hepatology: From Basic Science to Clinical Practice*, J. Rodés, J.-P. Benhamou, A.T. Blei, J. Reichen, and M. Rizzetto, eds. (Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd), pp. 174–181.

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.

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.

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.

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

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

Jopling, C.L., Schütz, S., and Sarnow, P. (2008). Position-dependent function for a tandem microRNA miR-122-binding site located in the hepatitis C virus RNA genome. *Cell Host Microbe* *4*, 77–85.

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.

Joyce, M.A., Walters, K.-A., Lamb, S.-E., Yeh, M.M., Zhu, L.-F., Kneteman, N., Doyle, J.S., Katze, M.G., and Tyrrell, D.L. (2009). HCV Induces Oxidative and ER Stress, and Sensitizes Infected Cells to Apoptosis in SCID/Alb-uPA Mice. *PLoS Pathog* *5*, e1000291.

## K

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.

Kambara, H., Fukuhara, T., Shiokawa, M., Ono, C., Ohara, Y., Kamitani, W., and Matsuura, Y. (2012). Establishment of a Novel Permissive Cell Line for the Propagation of Hepatitis C Virus by Expression of MicroRNA miR122. *J Virol* *86*, 1382–1393.

Kanda, T., Steele, R., Ray, R., and Ray, R.B. (2009). Inhibition of intrahepatic gamma interferon production by hepatitis C virus nonstructural protein 5A in transgenic mice. *J Virol* *83*, 8463–8469.

Kanto, T., and Hayashi, N. (2007). Innate immunity in hepatitis C virus infection: Interplay among dendritic cells, natural killer cells and natural killer T cells. *Hepatol Res* *37 Suppl 3*, S319–326.

Kanto, T., Hayashi, N., Takehara, T., Hagiwara, H., Mita, E., Naito, M., Kasahara, A., Fusamoto, H., and Kamada, T. (1994). Buoyant density of hepatitis C virus recovered from infected hosts: two different features in sucrose equilibrium density-gradient centrifugation related to degree of liver inflammation. *Hepatology* *19*, 296–302.

Kanto, T., Hayashi, N., Takehara, T., Hagiwara, H., Mita, E., Naito, M., Kasahara, A., Fusamoto, H., and Kamada, T. (1995). Density analysis of hepatitis C virus particle population in the circulation of infected hosts: implications for virus neutralization or persistence. *J Hepatol* *22*, 440–448.

Kapadia, S.B., and Chisari, F.V. (2005). Hepatitis C virus RNA replication is regulated by host geranylgeranylation and fatty acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 2561–2566.

Kapoor, A., Simmonds, P., Gerold, G., Qaisar, N., Jain, K., Henriquez, J.A., Firth, C., Hirschberg, D.L., Rice, C.M., Shields, S., et al. (2011). Characterization of a canine homolog of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* *108*, 11608–11613.

- Kato, T., Furusaka, A., Miyamoto, M., Date, T., Yasui, K., Hiramoto, J., Nagayama, K., Tanaka, T., and Wakita, T. (2001). Sequence analysis of hepatitis C virus isolated from a fulminant hepatitis patient. *J Med Virol* *64*, 334–339.
- Katsarou, K., Lavdas, A.A., Tsitoura, P., Serti, E., Markoulatos, P., Mavromara, P., and Georgopoulou, U. (2010). Endocytosis of hepatitis C virus non-enveloped capsid-like particles induces MAPK-ERK1/2 signaling events. *Cell Mol Life Sci* *67*, 2491–2506.
- Kau, A., Vermehren, J., and Sarrazin, C. (2008). Treatment predictors of a sustained virologic response in hepatitis B and C. *J Hepatol* *49*, 634–651.
- Kaul, A., Stauffer, S., Berger, C., Pertel, T., Schmitt, J., Kallis, S., Zayas, M., Lopez, M.Z., Lohmann, V., Luban, J., et al. (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.
- Ke, P.-Y., and Chen, S.S.-L. (2011a). Activation of the unfolded protein response and autophagy after hepatitis C virus infection suppresses innate antiviral immunity in vitro. *J Clin Invest* *121*, 37–56.
- Ke, P.-Y., and Chen, S.S.-L. (2011b). Autophagy: a novel guardian of HCV against innate immune response. *Autophagy* *7*, 533–535.
- Khaliq, S., Jahan, S., and Hassan, S. (2011). Hepatitis C virus p7: molecular function and importance in hepatitis C virus life cycle and potential antiviral target. *Liver Int* *31*, 606–617.
- Kim, J.H., Park, S.M., Park, J.H., Keum, S.J., and Jang, S.K. (2011a). eIF2A mediates translation of hepatitis C viral mRNA under stress conditions. *Embo J* *30*, 2454–2464.
- Kim, K., Kim, K.H., Ha, E., Park, J.Y., Sakamoto, N., and Cheong, J. (2009). Hepatitis C virus NS5A protein increases hepatic lipid accumulation via induction of activation and expression of PPARgamma. *FEBS Lett* *583*, 2720–2726.
- Kim, S., Welsch, C., Yi, M., and Lemon, S.M. (2011b). Regulation of the Production of Infectious Genotype 1a Hepatitis C Virus by NS5A Domain III. *J Virol* *85*, 6645–6656.
- Koike, K., Moriya, K., and Matsuura, Y. (2010). Animal models for hepatitis C and related liver disease. *Hepatol Res* *40*, 69–82.
- 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.
- 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.
- Kronenberg, M., and Gapin, L. (2002). The unconventional lifestyle of NKT cells. *Nat Rev Immunol* *2*, 557–568.
- ## L
- Lackmann, M., and Boyd, A.W. (2008). Eph, a protein family coming of age: more confusion, insight, or complexity? *Sci Signal* *1*, re2.
- Lagaye, S., Shen, H., Saunier, B., Nascimbeni, M., Gaston, J., Bourdoncle, P., Hannoun, L., Massault, P.P., Pichard, A.V., Mallet, V., et al. (2012). Efficient replication of primary or culture hepatitis C virus isolates in human liver slices: A relevant ex vivo model of liver infection. *Hepatology*.
- Lagging, M., Romero, A.I., Westin, J., Norkrans, G., Dhillon, A.P., Pawlotsky, J.-M., Zeuzem, S., von Wagner, M., Negro, F., Schalm, S.W., et al. (2006). IP-10 predicts viral response and therapeutic outcome in difficult-to-treat patients with HCV genotype 1 infection. *Hepatology* *44*, 1617–1625.
- Lai, C.-K., Jeng, K.-S., Machida, K., and Lai, M.M.C. (2010). Hepatitis C virus egress and release depend on endosomal trafficking of core protein. *J Virol* *84*, 11590–11598.
- 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.
- Lambotin, M., Baumert, T.F., and Barth, H. (2010). Distinct intracellular trafficking of hepatitis C virus in myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *J Virol* *84*, 8964–8969.

- Lanford, R.E., Hildebrandt-Eriksen, E.S., Petri, A., Persson, R., Lindow, M., Munk, M.E., Kauppinen, S., and Ørum, H. (2010). Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science* *327*, 198–201.
- Lavie, M., Goffard, A., and Dubuisson, J. (2007). Assembly of a functional HCV glycoprotein heterodimer. *Curr Issues Mol Biol* *9*, 71–86.
- Lavillette, D., Bartosch, B., Nourrisson, D., Verney, G., Cosset, F.-L., Penin, F., and Pécheur, E.-I. (2006). Hepatitis C virus glycoproteins mediate low pH-dependent membrane fusion with liposomes. *J Biol Chem* *281*, 3909–3917.
- Lázaro, C.A., Chang, M., Tang, W., Campbell, J., Sullivan, D.G., Gretch, D.R., Corey, L., Coombs, R.W., and Fausto, N. (2007). Hepatitis C virus replication in transfected and serum-infected cultured human fetal hepatocytes. *Am J Pathol* *170*, 478–489.
- Lechner, F., Wong, D.K., Dunbar, P.R., Chapman, R., Chung, R.T., Dohrenwend, P., Robbins, G., Phillips, R., Klenerman, P., and Walker, B.D. (2000). Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J Exp Med* *191*, 1499–1512.
- Lerat, H., Honda, M., Beard, M.R., Loesch, K., Sun, J., Yang, Y., Okuda, M., Gosert, R., Xiao, S.-Y., Weinman, S.A., et al. (2002). Steatosis and liver cancer in transgenic mice expressing the structural and nonstructural proteins of hepatitis C virus. *Gastroenterology* *122*, 352–365.
- Levrero, M. (2006). Viral hepatitis and liver cancer: the case of hepatitis C. *Oncogene* *25*, 3834–3847.
- Levy, S., Rubinstein, E., Dubuisson, J., Cocquerel, L., Rocha-Perugini, V., Montpellier, C., Delgrange, D., Wychowski, C., Helle, F., Pillez, A., et al. (2008). The CD81 partner EWI-2wint inhibits hepatitis C virus entry. *PLoS ONE* *3*, e1866.
- Lewis, A.P., and Jopling, C.L. (2010). Regulation and biological function of the liver-specific miR-122. *Biochem Soc. Trans.* *38*, 1553–1557.
- Li, K., Foy, E., Ferreón, J.C., Nakamura, M., Ferreón, A.C.M., Ikeda, M., Ray, S.C., Gale, M., Jr, and Lemon, S.M. (2005). Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 2992–2997.
- Li, S., Ye, L., Yu, X., Xu, B., Li, K., Zhu, X., Liu, H., Wu, X., and Kong, L. (2009). Hepatitis C virus NS4B induces unfolded protein response and endoplasmic reticulum overload response-dependent NF-kappaB activation. *Virology* *391*, 257–264.
- Liang, T.J., and Heller, T. (2004). Pathogenesis of hepatitis C-associated hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* *127*, S62–71.
- Liang, Y., Shilagard, T., Xiao, S.-Y., Snyder, N., Lau, D., Cicalese, L., Weiss, H., Vargas, G., and Lemon, S.M. (2009). Visualizing hepatitis C virus infections in human liver by two-photon microscopy. *Gastroenterology* *137*, 1448–1458.
- Lichtenberger, B.M., Tan, P.K., Niederleithner, H., Ferrara, N., Petzelbauer, P., and Sibilio, M. (2010). Autocrine VEGF signaling synergizes with EGFR in tumor cells to promote epithelial cancer development. *Cell* *140*, 268–279.
- Liddle, C., and Stedman, C.A.M. (2008). Hepatic metabolism of drugs. In *Textbook of Hepatology: From Basic Science to Clinical Practice*, J. Rodés, J.-P. Benhamou, A.T. Blei, J. Reichen, and M. Rizzetto, eds. (Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd), pp. 241–249.
- Lim, S.P., Soo, H.M., Tan, Y.H., Brenner, S., Horstmann, H., MacKenzie, J.M., Ng, M.L., Lim, S.G., and Hong, W. jin (2002). Inducible system in human hepatoma cell lines for hepatitis C virus production. *Virology* *303*, 79–99.
- Lin, W., Tsai, W.-L., Shao, R.-X., Wu, G., Peng, L.F., Barlow, L.L., Chung, W.J., Zhang, L., Zhao, H., Jang, J.-Y., et al. (2010). Hepatitis C virus regulates transforming growth factor beta1 production through the generation of reactive oxygen species in a nuclear factor kappaB-dependent manner. *Gastroenterology* *138*, 2509–2518, 2518.e1.
- Lin, Y., Havinga, R., Verkade, H.J., Moshage, H., Slooff, M.J., Vonk, R.J., and Kuipers, F. (1996). Bile acids suppress the secretion of very-low-density lipoprotein by human hepatocytes in primary culture. *Hepatology* *23*, 218–228.

- Lindenbach, B.D., Evans, M.J., Syder, A.J., Wölk, B., Tellinghuisen, T.L., Liu, C.C., Maruyama, T., Hynes, R.O., Burton, D.R., McKeating, J.A., et al. (2005). Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 309, 623–626.
- Lindenbach, B.D., Meuleman, P., Ploss, A., Vanwolleghe, 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, H.M., and Gale, M. (2010). Hepatitis C Virus Evasion from RIG-I-Dependent Hepatic Innate Immunity. *Gastroenterol Res Pract* 2010, 548390.
- Liu, S., McCormick, K.D., Zhao, W., Zhao, T., Fan, D., and Wang, T. (2012). Human apolipoprotein E peptides inhibit hepatitis C virus entry by blocking virus binding. *Hepatology*.
- Lohmann, V., Körner, 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.
- 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.
- Luedde, T., Trautwein, C., Mehal, W.Z., Imaeda, A.B., and Mehal, W.Z. (2008). Immunology of the Liver. In *Textbook of Hepatology: From Basic Science to Clinical Practice*, J. Rodés, J.-P. Benhamou, A.T. Blei, J. Reichen, and M. Rizzetto, eds. (Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd), pp. 312–331.
- Luik, P., Chew, C., Aittoniemi, J., Chang, J., Wentworth, P., Jr, Dwek, R.A., Biggin, P.C., Vénien-Bryan, C., and Zitzmann, N. (2009). The 3-dimensional structure of a hepatitis C virus p7 ion channel by electron microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 12712–12716.
- Lupberger, J., Felmlee, D.J., and Baumert, T.F. (2012). Cholesterol uptake and hepatitis C virus entry. *J Hepatol*.
- 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.
- Lusis, A.J., and Pajukanta, P. (2008). A treasure trove for lipoprotein biology. *Nat Genet* 40, 129–130.
- Lyn, R.K., Kennedy, D.C., Sagan, S.M., Blais, D.R., Rouleau, Y., Pegoraro, A.F., Xie, X.S., Stolow, A., and Pezacki, J.P. (2009). Direct imaging of the disruption of hepatitis C virus replication complexes by inhibitors of lipid metabolism. *Virology* 394, 130–142.
- Lyn, R.K., Kennedy, D.C., Stolow, A., Ridsdale, A., and Pezacki, J.P. (2010). Dynamics of lipid droplets induced by the hepatitis C virus core protein. *Biochem Biophys Res Commun* 399, 518–524.

## M

- Ma, Y., Anantpadma, M., Timpe, J.M., Shanmugam, S., Singh, S.M., Lemon, S.M., and Yi, M. (2011). Hepatitis C virus NS2 protein serves as a scaffold for virus assembly by interacting with both structural and nonstructural proteins. *J Virol* 85, 86–97.
- Ma, Y., Yates, J., Liang, Y., Lemon, S.M., and Yi, M. (2008). NS3 helicase domains involved in infectious intracellular hepatitis C virus particle assembly. *J Virol* 82, 7624–7639.
- Machado, M.V., and Cortez-Pinto, H. (2009). Insulin resistance and steatosis in chronic hepatitis C. *Ann Hepatol* 8 Suppl 1, S67–75.
- Maier, K., Hofmann, U., Reuss, M., and Mauch, K. (2010). Dynamics and control of the central carbon metabolism in hepatoma cells. *BMC Syst Biol* 4, 54.
- Maillard, P., Huby, T., Andréo, U., Moreau, M., Chapman, J., and Budkowska, A. (2006). The interaction of natural hepatitis C virus with human scavenger receptor SR-BI/Cla1 is mediated by ApoB-containing lipoproteins. *Faseb J* 20, 735–737.
- Maillard, P., Krawczynski, K., Nitkiewicz, J., Bronnert, C., Sidorkiewicz, M., Gounon, P., Dubuisson, J., Faure, G., Crainic, R., and Budkowska, A. (2001). Nonenveloped nucleocapsids of hepatitis C virus in the serum of infected patients. *J Virol* 75, 8240–8250.
- Maillard, P., Walic, M., Meuleman, P., Roohvand, F., Huby, T., Le Goff, W., Leroux-Roels, G., Pécheur, E.-I., and Budkowska, A. (2011). Lipoprotein lipase inhibits hepatitis C virus (HCV) infection by blocking virus cell entry. *PLoS ONE* 6, e26637.

- Majeau, N., Fromentin, R., Savard, C., Duval, M., Tremblay, M.J., and Leclerc, D. (2009). Palmitoylation of hepatitis C virus core protein is important for virion production. *J Biol Chem* *284*, 33915–33925.
- Majeau, N., Gagné, V., Boivin, A., Bolduc, M., Majeau, J.-A., Ouellet, D., and Leclerc, D. (2004). The N-terminal half of the core protein of hepatitis C virus is sufficient for nucleocapsid formation. *J Gen Virol* *85*, 971–981.
- Malhotra, J.D., and Kaufman, R.J. (2007). Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword? *Antioxid Redox Signal* *9*, 2277–2293.
- Mancone, C., Montaldo, C., Santangelo, L., Di Giacomo, C., Costa, V., Amicone, L., Ippolito, G., Pucillo, L.P., Alonzi, T., and Tripodi, M. (2012). Ferritin heavy chain is the host factor responsible for HCV-induced inhibition of apoB-100 production and is required for efficient viral infection. *J Proteome Res.*
- Mancone, C., Steindler, C., Santangelo, L., Simonte, G., Vlassi, C., Longo, M.A., D’Offizi, G., Di Giacomo, C., Pucillo, L.P., Amicone, L., et al. (2011). Hepatitis C virus production requires apolipoprotein A-I and affects its association with nascent low-density lipoproteins. *Gut* *60*, 378–386.
- Manns, M.P., McHutchison, J.G., Gordon, S.C., Rustgi, V.K., Shiffman, M., Reindollar, R., Goodman, Z.D., Koury, K., Ling, M., and Albrecht, J.K. (2001). Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* *358*, 958–965.
- Manns, M.P., Wedemeyer, H., and Cornberg, M. (2006). Treating viral hepatitis C: efficacy, side effects, and complications. *Gut* *55*, 1350–1359.
- Martell, M., Esteban, J.I., Quer, J., Genescà, J., Weiner, A., Esteban, R., Guardia, J., and Gómez, 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, N.K., Vickerman, P., Miners, A., Foster, G.R., Hutchinson, S.J., Goldberg, D.J., and Hickman, M. (2012). Cost-effectiveness of hepatitis C virus antiviral treatment for injection drug user populations. *Hepatology* *55*, 49–57.
- Martin, S., and Parton, R.G. (2006). Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle. *Nat Rev Mol Cell Biol* *7*, 373–378.
- Martin-Serrano, J., and Neil, S.J.D. (2011). Host factors involved in retroviral budding and release. *Nat Rev Microbiol* *9*, 519–531.
- Mazumdar, B., Banerjee, A., Meyer, K., and Ray, R. (2011). Hepatitis C virus E1 envelope glycoprotein interacts with apolipoproteins in facilitating entry into hepatocytes. *Hepatology* *54*, 1149–1156.
- McCormick, C.J., Challinor, L., Macdonald, A., Rowlands, D.J., and Harris, M. (2004). Introduction of replication-competent hepatitis C virus transcripts using a tetracycline-regulable baculovirus delivery system. *J Gen Virol* *85*, 429–439.
- McGivern, D.R., and Lemon, S.M. (2011). Virus-specific mechanisms of carcinogenesis in hepatitis C virus associated liver cancer. *Oncogene* *30*, 1969–1983.
- 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., Farquhar, M.J., Harris, H.J., Hu, K., Ramma, W., Ahmed, A., Maurel, P., Bicknell, R., Balfe, P., and McKeating, J.A. (2010). Hepatitis C virus infection reduces hepatocellular polarity in a vascular endothelial growth factor-dependent manner. *Gastroenterology* *138*, 1134–1142.
- Mee, C.J., Harris, H.J., Farquhar, M.J., Wilson, G., Reynolds, G., Davis, C., van IJendoorn, S.C.D., Balfe, P., and McKeating, J.A. (2009). Polarization restricts hepatitis C virus entry into HepG2 hepatoma cells. *J Virol* *83*, 6211–6221.
- 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.
- Meex, S.J.R., Andreo, U., Sparks, J.D., and Fisher, E.A. (2011). Huh-7 or HepG2 cells: which is the better model for studying human apolipoprotein-B100 assembly and secretion? *J Lipid Res* *52*, 152–158.
- Memon, M.I., and Memon, M.A. (2002). Hepatitis C: an epidemiological review. *J Viral Hepat* *9*, 84–100.
- Mensenkamp, A.R., Havekes, L.M., Romijn, J.A., and Kuipers, F. (2001). Hepatic steatosis and very low density lipoprotein secretion: the involvement of apolipoprotein E. *J Hepatol* *35*, 816–822.

Mensenkamp, A.R., Jong, M.C., van Goor, H., van Luyn, M.J., Bloks, V., Havinga, R., Voshol, P.J., Hofker, M.H., van Dijk, K.W., Havekes, L.M., et al. (1999). Apolipoprotein E participates in the regulation of very low density lipoprotein-triglyceride secretion by the liver. *J Biol Chem* 274, 35711–35718.

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.

Meredith, L.W., Wilson, G.K., Fletcher, N.F., and McKeating, J.A. (2012). Hepatitis C virus entry: beyond receptors. *Rev Med Virol*.

Merquiol, E., Uzi, D., Mueller, T., Goldenberg, D., Nahmias, Y., Xavier, R.J., Tirosh, B., and Shibolet, O. (2011). HCV causes chronic endoplasmic reticulum stress leading to adaptation and interference with the unfolded protein response. *PLoS ONE* 6, e24660.

Merz, A., Long, G., Hiet, M.-S., Brügger, B., Chlanda, P., Andre, P., Wieland, F., Krijnse-Locker, J., and Bartenschlager, R. (2011). Biochemical and morphological properties of hepatitis C virus particles and determination of their lipidome. *J Biol Chem* 286, 3018–3032.

Meuleman, P., Bukh, J., Verhoye, L., Farhoudi, A., Vanwolleghe, T., Wang, R.Y., Desombere, I., Alter, H., Purcell, R.H., and Leroux-Roels, G. (2011). In vivo evaluation of the cross-genotype neutralizing activity of polyclonal antibodies against hepatitis C virus. *Hepatology* 53, 755–762.

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., 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., Russell, R.S., Engle, R.E., Faulk, K.N., Purcell, R.H., and Emerson, S.U. (2008). Apolipoprotein c1 association with hepatitis C virus. *J Virol* 82, 9647–9656.

Meylan, E., Curran, J., Hofmann, K., Moradpour, D., Binder, M., Bartenschlager, R., and Tschopp, J. (2005). Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* 437, 1167–1172.

Miller, S., and Krijnse-Locker, J. (2008). Modification of intracellular membrane structures for virus replication. *Nat Rev Microbiol* 6, 363–374.

Minola, E., Prati, D., Suter, F., Maggiolo, F., Caprioli, F., Sonzogni, A., Fraquelli, M., Paggi, S., and Conte, D. (2002). Age at infection affects the long-term outcome of transfusion-associated chronic hepatitis C. *Blood* 99, 4588–4591.

Mirandola, S., Realdon, S., Iqbal, J., Gerotto, M., Dal Pero, F., Bortoletto, G., Marcolongo, M., Vario, A., Datz, C., Hussain, M.M., et al. (2006). Liver microsomal triglyceride transfer protein is involved in hepatitis C liver steatosis. *Gastroenterology* 130, 1661–1669.

Miyazawa, 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., Roitman, 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.

Molina-Jimenez, F., Benedicto, I., Dao Thi, V.L., Gondar, V., Lavillette, D., Marin, J.J., Briz, O., Moreno-Otero, R., Aldabe, R., Baumert, T.F., et al. (2012). Matrigel-embedded 3D culture of Huh-7 cells as a hepatocyte-like polarized system to study hepatitis C virus cycle. *Virology*.

Montpellier, C., Tews, B.A., Poitrimole, J., Rocha-Perugini, V., D'Arienzo, V., Potel, J., Zhang, X.A., Rubinstein, E., Dubuisson, J., and Cocquerel, L. (2011). Interacting regions of CD81 and two of its partners, EWI-2 and EWI-2wint, and their effect on hepatitis C virus infection. *J Biol Chem* 286, 13954–13965.

Montserret, R., Saint, N., Vanbelle, C., Salvay, A.G., Simorre, J.-P., Ebel, C., Sapay, N., Renisio, J.-G., Böckmann, A., Steinmann, E., et al. (2010). NMR structure and ion channel activity of the p7 protein from hepatitis C virus. *J Biol Chem* 285, 31446–31461.

Moradpour, D., Brass, V., Bieck, E., Friebe, P., Gosert, R., Blum, H.E., Bartenschlager, R., Penin, F., and Lohmann, V. (2004). Membrane association of the RNA-dependent RNA polymerase is essential for hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* 78, 13278–13284.

Moradpour, D., Kary, P., Rice, C.M., and Blum, H.E. (1998). Continuous human cell lines inducibly expressing hepatitis C virus structural and nonstructural proteins. *Hepatology* 28, 192–201.

Moradpour, D., Müllhaupt, B., and Swiss, A. (2012). Treatment of chronic hepatitis C genotype 1 with triple therapy comprising telaprevir or boceprevir. *Swiss Med Wkly* 142, 0.

Moradpour, D., Penin, F., and Rice, C.M. (2007). Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Microbiol* 5, 453–463.

Moriishi, K., and Matsuura, Y. (2007). Host factors involved in the replication of hepatitis C virus. *Rev Med Virol* 17, 343–354.

Moriishi, K., Okabayashi, T., Nakai, K., Moriya, K., Koike, K., Murata, S., Chiba, T., Tanaka, K., Suzuki, R., Suzuki, T., et al. (2003). Proteasome activator PA28gamma-dependent nuclear retention and degradation of hepatitis C virus core protein. *J Virol* 77, 10237–10249.

Moriishi, K., Shoji, I., Mori, Y., Suzuki, R., Suzuki, T., Kataoka, C., and Matsuura, Y. (2010). Involvement of PA28gamma in the propagation of hepatitis C virus. *Hepatology* 52, 411–420.

Moucari, R., Asselah, T., Cazals-Hatem, D., Voitot, H., Boyer, N., Ripault, M.-P., Sobesky, R., Martinot-Peignoux, M., Maylin, S., Nicolas-Chanoine, M.-H., et al. (2008). Insulin resistance in chronic hepatitis C: association with genotypes 1 and 4, serum HCV RNA level, and liver fibrosis. *Gastroenterology* 134, 416–423.

Muir, A.J., Shiffman, M.L., Zaman, A., Yoffe, B., de la Torre, A., Flamm, S., Gordon, S.C., Marotta, P., Vierling, J.M., Lopez-Talavera, J.C., et al. (2010). Phase 1b study of pegylated interferon lambda 1 with or without ribavirin in patients with chronic genotype 1 hepatitis C virus infection. *Hepatology* 52, 822–832.

Murakawa, K., Esumi, M., Kato, T., Kambara, H., and Shikata, T. (1992). Heterogeneity within the nonstructural protein 5-encoding region of hepatitis C viruses from a single patient. *Gene* 117, 229–232.

Murphy, S., Martin, S., and Parton, R.G. (2009). Lipid droplet-organelle interactions; sharing the fats. *Biochim Biophys Acta* 1791, 441–447.

## N

Nahmias, Y., Goldwasser, J., Casali, M., van Poll, D., Wakita, T., Chung, R.T., and Yarmush, M.L. (2008). Apolipoprotein B-dependent hepatitis C virus secretion is inhibited by the grapefruit flavonoid naringenin. *Hepatology* 47, 1437–1445.

Nakamoto, S., Imazeki, F., Fukai, K., Fujiwara, K., Arai, M., Kanda, T., Yonemitsu, Y., and Yokosuka, O. (2010). Association between mutations in the core region of hepatitis C virus genotype 1 and hepatocellular carcinoma development. *J Hepatol* 52, 72–78.

Narbus, C.M., Israelow, B., Sourisseau, M., Michta, M.L., Hopcraft, S.E., Zeiner, G.M., and Evans, M.J. (2011). HepG2 cells expressing microRNA miR-122 support the entire hepatitis C virus life cycle. *J Virol* 85, 12087–12092.

Nash, K.L., Bentley, I., and Hirschfield, G.M. (2009). Managing hepatitis C virus infection. *BMJ* 338, b2366.

Ndjomou, J., Park, I.-W., Liu, Y., Mayo, L.D., and He, J.J. (2009). Up-Regulation of Hepatitis C Virus Replication and Production by Inhibition of MEK/ERK Signaling. *PLoS ONE* 4, e7498.

Negro, F. (2010). Abnormalities of lipid metabolism in hepatitis C virus infection. *Gut* 59, 1279–1287.

Netski, D.M., Mosbrugger, T., Depla, E., Maertens, G., Ray, S.C., Hamilton, R.G., Roundtree, S., Thomas, D.L., McKeating, J., and Cox, A. (2005). Humoral immune response in acute hepatitis C virus infection. *Clin Infect Dis* 41, 667–675.

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

## O

Ohsaki, Y., Cheng, J., Suzuki, M., Fujita, A., and Fujimoto, T. (2008). Lipid droplets are arrested in the ER membrane by tight binding of lipidated apolipoprotein B-100. *J Cell Sci* 121, 2415–2422.

Ohsaki, Y., Cheng, J., Suzuki, M., Shinohara, Y., Fujita, A., and Fujimoto, T. (2009). Biogenesis of cytoplasmic lipid droplets: from the lipid ester globule in the membrane to the visible structure. *Biochim Biophys Acta* 1791, 399–407.

Okamoto, T., Nishimura, Y., Ichimura, T., Suzuki, K., Miyamura, T., Suzuki, T., Moriishi, K., and Matsuura, Y. (2006). Hepatitis C virus RNA replication is regulated by FKBP8 and Hsp90. *Embo J* 25, 5015–5025.

Okuda, M., Li, K., Beard, M.R., Showalter, L.A., Scholle, F., Lemon, S.M., and Weinman, S.A. (2002). Mitochondrial injury, oxidative stress, and antioxidant gene expression are induced by hepatitis C virus core protein. *Gastroenterology* 122, 366–375.

Olofsson, S.-O., Boström, P., Andersson, L., Rutberg, M., Perman, J., and Borén, J. (2009). Lipid droplets as dynamic organelles connecting storage and efflux of lipids. *Biochim Biophys Acta* 1791, 448–458.

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

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

Ozeki, S., Cheng, J., Tauchi-Sato, K., Hatano, N., Taniguchi, H., and Fujimoto, T. (2005). Rab18 Localizes to Lipid Droplets and Induces Their Close Apposition to the Endoplasmic Reticulum-Derived Membrane. *J Cell Sci* 118, 2601–2611.

## P

Pagliaccetti, N.E., and Robek, M.D. (2010). Interferon- $\lambda$  in HCV Infection and Therapy. *Viruses* 2, 1589–1602.

Parent, R., Qu, X., Petit, M.-A., and Beretta, L. (2009). The heat shock cognate protein 70 is associated with hepatitis C virus particles and modulates virus infectivity. *Hepatology* 49, 1798–1809.

Park, C.-Y., Jun, H.-J., Wakita, T., Cheong, J.H., and Hwang, S.B. (2009). Hepatitis C virus nonstructural 4B protein modulates sterol regulatory element-binding protein signaling via the AKT pathway. *J Biol Chem* 284, 9237–9246.

Paul, D., Romero-Brey, I., Gouttenoire, J., Stoitsova, S., Krijnse-Locker, J., Moradpour, D., and Bartenschlager, R. (2011). NS4B self-interaction through conserved C-terminal elements is required for the establishment of functional hepatitis C virus replication complexes. *J Virol* 85, 6963–6976.

Pawlotsky, J.-M., Cocquerel, L., Durantel, D., Lavillette, D., Lerat, H., Pécheur, E.-I., Polyak, S.J., Tautz, N., and Thimme, R. (2010). HCV research 20 years after discovery: a summary of the 16th international symposium on hepatitis C virus and related viruses. *Gastroenterology* 138, 6–12.e1–2.

Peng, L., Liang, D., Tong, W., Li, J., and Yuan, Z. (2010a). Hepatitis C virus NS5A activates the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway, contributing to cell survival by disrupting the interaction between FK506-binding protein 38 (FKBP38) and mTOR. *J Biol Chem* 285, 20870–20881.

Peng, Z.-G., Fan, B., Du, N.-N., Wang, Y.-P., Gao, L.-M., Li, Y.-H., Li, Y.-H., Liu, F., You, X.-F., Han, Y.-X., et al. (2010b). Small molecular compounds that inhibit hepatitis C virus replication through destabilizing heat shock cognate 70 messenger RNA. *Hepatology* 52, 845–853.

Penin, F., Brass, V., Appel, N., Ramboarina, S., Montserret, R., Ficheux, D., Blum, H.E., Bartenschlager, R., and Moradpour, D. (2004). Structure and function of the membrane anchor domain of hepatitis C virus nonstructural protein 5A. *J Biol Chem* 279, 40835–40843.

Penin, F., Combet, C., Germanidis, G., Frainais, P.O., Deléage, G., and Pawlotsky, J.M. (2001). Conservation of the conformation and positive charges of hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein hypervariable region 1 points to a role in cell attachment. *J. Virol.* 75, 5703–5710.

Perlemuter, G., Sabile, A., Letteron, P., Vona, G., Topilco, A., Chrétien, Y., Koike, K., Pessayre, D., Chapman, J., Barba, G., et al. (2002). Hepatitis C virus core protein inhibits microsomal triglyceride transfer protein activity and very low density lipoprotein secretion: a model of viral-related steatosis. *Faseb J.* 16, 185–194.

Perrin-Cocon, L., Agaugué, S., Diaz, O., Vanbervliet, B., Dollet, S., Guironnet-Paquet, A., André, P., and Lotteau, V. (2008). Th1 disabled function in response to TLR4 stimulation of monocyte-derived DC from patients chronically-infected by hepatitis C virus. *PLoS ONE* 3, e2260.

- Petit, J.M., Benichou, M., Duvillard, L., Jooste, V., Bour, J.B., Minello, A., Verges, B., Brun, J.M., Gambert, P., and Hillon, P. (2003). Hepatitis C virus-associated hypobetalipoproteinemia is correlated with plasma viral load, steatosis, and liver fibrosis. *Am. J. Gastroenterol.* *98*, 1150–1154.
- Petit, M.-A., Lièvre, M., Peyrol, S., De Sequeira, S., Berthillon, P., Ruigrok, R.W.H., and Trépo, C. (2005). Enveloped particles in the serum of chronic hepatitis C patients. *Virology* *336*, 144–153.
- Pfannkuche, A., Büther, K., Karthe, J., Poenisch, M., Bartenschlager, R., Trilling, M., Hengel, H., Willbold, D., Häussinger, 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.
- 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.
- Pinzani, M. (2008). The Hepatic Stellate Cell. In *Textbook of Hepatology: From Basic Science to Clinical Practice*, J. Rodés, J.-P. Benhamou, A.T. Blei, J. Reichen, and M. Rizzetto, eds. (Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd), pp. 43–51.
- Piodi, A., Chouteau, P., Lerat, H., Hézode, C., and Pawlotsky, J.-M. (2008). Morphological changes in intracellular lipid droplets induced by different hepatitis C virus genotype core sequences and relationship with steatosis. *Hepatology* *48*, 16–27.
- Ploss, A., and Evans, M.J. (2012). Hepatitis C virus host cell entry. *Curr Opin Virol* *2*, 14–19.
- 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., Khetani, S.R., Jones, C.T., Syder, A.J., Trehan, K., Gaysinskaya, V.A., Mu, K., Ritola, K., Rice, C.M., and Bhatia, S.N. (2010). Persistent hepatitis C virus infection in microscale primary human hepatocyte cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 3141–3145.
- Ploss, A., and Rice, C.M. (2009). Towards a small animal model for hepatitis C. *EMBO Rep* *10*, 1220–1227.
- Podevin, P., Carpentier, A., Pène, V., Aoudjehane, L., Carrière, M., Zaïdi, S., Hernandez, C., Calle, V., Méritet, J.-F., Scatton, O., et al. (2010). Production of infectious hepatitis C virus in primary cultures of human adult hepatocytes. *Gastroenterology* *139*, 1355–1364.
- Pöhlmann, 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.
- Polyak, S.J., Khabar, K.S., Paschal, D.M., Ezelle, H.J., Duverlie, G., Barber, G.N., Levy, D.E., Mukaida, N., and Gretch, D.R. (2001). Hepatitis C virus nonstructural 5A protein induces interleukin-8, leading to partial inhibition of the interferon-induced antiviral response. *J Virol* *75*, 6095–6106.
- Popescu, C.-I., Callens, N., Trinel, D., Roingard, P., Moradpour, D., Descamps, V., Duverlie, G., Penin, F., Hélot, L., Rouillé, Y., et al. (2011). NS2 protein of hepatitis C virus interacts with structural and non-structural proteins towards virus assembly. *PLoS Pathog* *7*, e1001278.
- Postic, C., and Girard, J. (2008). Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. *J Clin Invest* *118*, 829–838.

## Q

- Quinkert, D., Bartenschlager, R., and Lohmann, V. (2005). Quantitative analysis of the hepatitis C virus replication complex. *J Virol* *79*, 13594–13605.

## R

- Ramcharran, D., Wahed, A.S., Conjeevaram, H.S., Evans, R.W., Wang, T., Belle, S.H., and Yee, L.J. (2010). Associations between serum lipids and hepatitis C antiviral treatment efficacy. *Hepatology* *52*, 854–863.
- Raney, K.D., Sharma, S.D., Moustafa, I.M., and Cameron, C.E. (2010). Hepatitis C virus non-structural protein 3 (HCV NS3): a multifunctional antiviral target. *J Biol Chem* *285*, 22725–22731.

Rasmussen, A.L., Tchitchek, N., Susnow, N.J., Krasnoselsky, A.L., Diamond, D.L., Yeh, M.M., Proll, S.C., Korth, M.J., Walters, K.-A., Lederer, S., et al. (2012). Early transcriptional programming links progression to hepatitis C virus-induced severe liver disease in transplant patients. *Hepatology*.

Raulet, D.H., and Vance, R.E. (2006). Self-tolerance of natural killer cells. *Nat Rev Immunol* 6, 520–531.

Rautou, P.-E., Cazals-Hatem, D., Feldmann, G., Mansouri, A., Grodet, A., Barge, S., Martinot-Peignoux, M., Duces, A., Bièche, I., Lebrech, D., et al. (2011). Changes in autophagic response in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Am J Pathol* 178, 2708–2715.

Ray, K. (2012). Hepatitis: NPC1L1 identified as a novel HCV entry factor. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*.

Régeard, M., Lepère, C., Trotard, M., Gripon, P., and Le Seyec, J. (2007). Recent contributions of in vitro models to our understanding of hepatitis C virus life cycle. *Febs J* 274, 4705–4718.

Rehermann, B. (2009). Hepatitis C virus versus innate and adaptive immune responses: a tale of coevolution and coexistence. *J Clin Invest* 119, 1745–1754.

Reiss, S., Rebhan, I., Backes, P., Romero-Brey, I., Erfle, H., Matula, P., Kaderali, L., Poenisch, M., Blankenburg, H., Hiet, M.-S., et al. (2011). Recruitment and activation of a lipid kinase by hepatitis C virus NS5A is essential for integrity of the membranous replication compartment. *Cell Host Microbe* 9, 32–45.

Renato, P., Correa, A.V., Nathanson, M.H., Wolkoff, A.W., Novikoff, P.M., Thevananther, S., Karpen, S.J., Elferink, R.P.J.O., Püschel, G.P., and Stieger, B. (2008). Functions of the Liver. In *Textbook of Hepatology: From Basic Science to Clinical Practice*, J. Rodés, J.-P. Benhamou, A.T. Blei, J. Reichen, and M. Rizzetto, eds. (Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd), pp. 89–128.

Revie, D., and Salahuddin, S.Z. (2011). Human cell types important for hepatitis C virus replication in vivo and in vitro: old assertions and current evidence. *Virology* 438, 346.

Rijnbrand, R., Bredenbeek, P., van der Straaten, T., Whetter, L., Inchauspé, G., Lemon, S., and Spaan, W. (1995). Almost the entire 5' non-translated region of hepatitis C virus is required for cap-independent translation. *FEBS Lett* 365, 115–119.

Robenek, H., Buers, I., Hofnagel, O., Robenek, M.J., Troyer, D., and Severs, N.J. (2009). Compartmentalization of proteins in lipid droplet biogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1791, 408–418.

Robertson, B., Myers, G., Howard, C., Brettin, T., Bukh, J., Gaschen, B., Gojobori, T., Maertens, G., Mizokami, M., Nainan, O., et al. (1998). Classification, nomenclature, and database development for hepatitis C virus (HCV) and related viruses: proposals for standardization. *International Committee on Virus Taxonomy. Arch Virol* 143, 2493–2503.

Rodrigue-Gervais, I.G., Rigsby, H., Jouan, L., Sauvé, D., Sékaly, R.-P., Willems, B., and Lamarre, D. (2010). Dendritic cell inhibition is connected to exhaustion of CD8+ T cell polyfunctionality during chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol* 184, 3134–3144.

Roingeard, P., and Depla, M. (2011). The birth and life of lipid droplets: learning from the hepatitis C virus. *Biol Cell* 103, 223–231.

Roingeard, P., and Hourieux, C. (2008). Hepatitis C virus core protein, lipid droplets and steatosis. *J Viral Hepat* 15, 157–164.

Roingeard, P., Hourieux, C., Blanchard, E., and Prensier, G. (2008). Hepatitis C virus budding at lipid droplet-associated ER membrane visualized by 3D electron microscopy. *Histochem Cell Biol* 130, 561–566.

Romero-Gómez, M., Del Mar Vitoria, M., Andrade, R.J., Salmerón, J., Diago, M., Fernández-Rodríguez, C.M., Corpas, R., Cruz, M., Grande, L., Vázquez, L., et al. (2005). Insulin resistance impairs sustained response rate to peginterferon plus ribavirin in chronic hepatitis C patients. *Gastroenterology* 128, 636–641.

Romero-López, C., and Berzal-Herranz, A. (2009). A long-range RNA-RNA interaction between the 5' and 3' ends of the HCV genome. *RNA* 15, 1740–1752.

Romero-López, C., and Berzal-Herranz, A. (2012). The functional RNA domain 5BSL3.2 within the NS5B coding sequence influences hepatitis C virus IRES-mediated translation. *Cell Mol Life Sci* 69, 103–113.

Roohvand, F., Maillard, P., Lavergne, J.-P., Boulant, S., Walic, M., Andréo, U., Goueslain, L., Helle, F., Mallet, A., McLauchlan, J., et al. (2009). Initiation of hepatitis C virus infection requires the dynamic microtubule network: role of the viral nucleocapsid protein. *J Biol Chem* 284, 13778–13791.

Rouillé, Y., Helle, F., Delgrange, D., Roingeard, P., Voisset, C., Blanchard, E., Belouzard, S., McKeating, J., Patel, A.H., Maertens, G., et al. (2006). Subcellular localization of hepatitis C virus structural proteins in a cell culture system that efficiently replicates the virus. *J Virol* *80*, 2832–2841.

Roy, K., Hay, G., Andragetti, R., Taylor, A., Goldberg, D., and Wiessing, L. (2002). Monitoring hepatitis C virus infection among injecting drug users in the European Union: a review of the literature. *Epidemiol Infect* *129*, 577–585.

## S

Sainz, B., and Chisari, F.V. (2006). Production of infectious hepatitis C virus by well-differentiated, growth-arrested human hepatoma-derived cells. *J Virol* *80*, 10253–10257.

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. *Viol J* *9*, 30.

Sainz, B., TenCate, V., and Uprichard, S.L. (2009). Three-dimensional Huh7 cell culture system for the study of Hepatitis C virus infection. *Viol J* *6*, 103.

Saito, T., Owen, D.M., Jiang, F., Marcotrigiano, J., and Gale, M. (2008). Innate immunity induced by composition-dependent RIG-I recognition of hepatitis C virus RNA. *Nature* *454*, 523–527.

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.

Sakamoto, H., Okamoto, K., Aoki, M., Kato, H., Katsume, A., Ohta, A., Tsukuda, T., Shimma, N., Aoki, Y., Arisawa, M., et al. (2005). Host sphingolipid biosynthesis as a target for hepatitis C virus therapy. *Nat Chem Biol* *1*, 333–337.

Sala-Valdés, M., Ursa, A., Charrin, S., Rubinstein, E., Hemler, M.E., Sánchez-Madrid, F., and Yáñez-Mó, M. (2006). EWI-2 and EWI-F link the tetraspanin web to the actin cytoskeleton through their direct association with ezrin-radixin-moesin proteins. *J Biol Chem* *281*, 19665–19675.

Saltiel, A.R., and Kahn, C.R. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* *414*, 799–806.

Samsa, M.M., Mondotte, J.A., Iglesias, N.G., Assunção-Miranda, I., Barbosa-Lima, G., Da Poian, A.T., Bozza, P.T., and Gamarnik, A.V. (2009). Dengue virus capsid protein usurps lipid droplets for viral particle formation. *PLoS Pathog* *5*, e1000632.

Santos, S.D.M., Verveer, P.J., and Bastiaens, P.I.H. (2007). Growth factor-induced MAPK network topology shapes Erk response determining PC-12 cell fate. *Nat Cell Biol* *9*, 324–330.

Saxena, V., Lai, C.-K., Chao, T.-C., Jeng, K.-S., and Lai, M.M.C. (2012). Annexin A2 is involved in the formation of hepatitis C virus replication complex on the lipid raft. *J Virol*.

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.

Scholtes, C., Ramière, C., Rainteau, D., Perrin-Cocon, L., Wolf, C., Humbert, L., Carreras, M., Guironnet-Paquet, A., Zoulim, F., Bartenschlager, R., et al. (2012). High plasma level of nucleocapsid-free envelope glycoprotein-positive lipoproteins in hepatitis C patients. *Hepatology*.

Seki, E., and Brenner, D.A. (2008). Toll-like receptors and adaptor molecules in liver disease: update. *Hepatology* *48*, 322–335.

Semela, D., and Shah, V.H. (2008). Liver Sinusoidal Endothelial Cells. In *Textbook of Hepatology: From Basic Science to Clinical Practice*, J. Rodés, J.-P. Benhamou, A.T. Blei, J. Reichen, and M. Rizzetto, eds. (Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd), pp. 29–35.

Sène, D., Levasseur, F., Abel, M., Lambert, M., Camous, X., Hernandez, C., Pène, V., Rosenberg, A.R., Jouvin-Marche, E., Marche, P.N., et al. (2010). Hepatitis C virus (HCV) evades NKG2D-dependent NK cell responses through NSSA-mediated imbalance of inflammatory cytokines. *PLoS Pathog* *6*, e1001184.

- Serejo, F., Emerit, I., Filipe, P.M., Fernandes, A.C., Costa, M.A., Freitas, J.P., and de Moura, M.C. (2003). Oxidative stress in chronic hepatitis C: the effect of interferon therapy and correlation with pathological features. *Can J Gastroenterol* 17, 644–650.
- Serfaty, L., Andreani, T., Giral, P., Carbonell, N., Chazouillères, O., and Poupon, R. (2001). Hepatitis C virus induced hypobetalipoproteinemia: a possible mechanism for steatosis in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 34, 428–434.
- Serfaty, L., and Capeau, J. (2009). Hepatitis C, insulin resistance and diabetes: clinical and pathogenic data. *Liver Int* 29 *Suppl* 2, 13–25.
- Shavinskaya, A., Boulant, S., Penin, F., McLauchlan, J., and Bartenschlager, R. (2007). The lipid droplet binding domain of hepatitis C virus core protein is a major determinant for efficient virus assembly. *J Biol Chem* 282, 37158–37169.
- Sheikh, M.Y., Choi, J., Qadri, I., Friedman, J.E., and Sanyal, A.J. (2008). Hepatitis C virus infection: molecular pathways to metabolic syndrome. *Hepatology* 47, 2127–2133.
- Shelness, G.S., and Sellers, J.A. (2001). Very-low-density lipoprotein assembly and secretion. *Curr Opin Lipidol* 12, 151–157.
- Shepard, C.W., Finelli, L., and Alter, M.J. (2005). Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis* 5, 558–567.
- Sheridan, D.A., Price, D.A., Schmid, M.L., Toms, G.L., Donaldson, P., Neely, D., and Bassendine, M.F. (2009). Apolipoprotein B-associated cholesterol is a determinant of treatment outcome in patients with chronic hepatitis C virus infection receiving anti-viral agents interferon-alpha and ribavirin. *Aliment Pharmacol Ther* 29, 1282–1290.
- Shi, F.-D., Ljunggren, H.-G., La Cava, A., and Van Kaer, L. (2011). Organ-specific features of natural killer cells. *Nat Rev Immunol* 11, 658–671.
- Shimizu, Y., Hishiki, T., Sugiyama, K., Ogawa, K., Funami, K., Kato, A., Ohsaki, Y., Fujimoto, T., Takaku, H., and Shimotohno, K. (2010). Lipoprotein lipase and hepatic triglyceride lipase reduce the infectivity of hepatitis C virus (HCV) through their catalytic activities on HCV-associated lipoproteins. *Virology* 407, 152–159.
- Shirakura, M., Murakami, K., Ichimura, T., Suzuki, R., Shimoji, T., Fukuda, K., Abe, K., Sato, S., Fukasawa, M., Yamakawa, Y., et al. (2007). E6AP ubiquitin ligase mediates ubiquitylation and degradation of hepatitis C virus core protein. *J Virol* 81, 1174–1185.
- Silver, D.L. (2009). Hepatic Fatty Acid Metabolism and Dysfunction. In *The Liver*, I.M. Arias, ed. (Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd), pp. 257–270.
- Simmonds, P., Bukh, J., Combet, C., Deléage, G., Enomoto, N., Feinstone, S., Halfon, P., Inchauspé, 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.
- Simmonds, P., Smith, D.B., McOmish, F., Yap, P.L., Kolberg, J., Urdea, M.S., and Holmes, E.C. (1994). Identification of genotypes of hepatitis C virus by sequence comparisons in the core, E1 and NS-5 regions. *J Gen Virol* 75 ( Pt 5), 1053–1061.
- Sir, D., Chen, W.-L., Choi, J., Wakita, T., Yen, T.S.B., and Ou, J.-H.J. (2008a). Induction of incomplete autophagic response by hepatitis C virus via the unfolded protein response. *Hepatology* 48, 1054–1061.
- Sir, D., Liang, C., Chen, W., Jung, J.U., and Ou, J.J. (2008b). Perturbation of autophagic pathway by hepatitis C virus. *Autophagy* 4, 830–831.
- Sklan, E.H., Charuworn, P., Pang, P.S., and Glenn, J.S. (2009). Mechanisms of HCV survival in the host. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 6, 217–227.
- Song, Y., Friebe, P., Tzima, E., Jünemann, 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.
- Steinberg, D. (1996). A docking receptor for HDL cholesterol esters. *Science* 271, 460–461.
- Su, W.-C., Chao, T.-C., Huang, Y.-L., Weng, S.-C., Jeng, K.-S., and Lai, M.M.C. (2011). Rab5 and class III phosphoinositide 3-kinase Vps34 are involved in hepatitis C virus NS4B-induced autophagy. *J Virol* 85, 10561–10571.

Sumpter, R., Jr, Loo, Y.-M., Foy, E., Li, K., Yoneyama, M., Fujita, T., Lemon, S.M., and Gale, M., Jr (2005). Regulating intracellular antiviral defense and permissiveness to hepatitis C virus RNA replication through a cellular RNA helicase, RIG-I. *J Virol* 79, 2689–2699.

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.

## T

Tachi, Y., Katano, Y., Honda, T., Hayashi, K., Ishigami, M., Itoh, A., Hirooka, Y., Nakano, I., Samejima, Y., and Goto, H. (2010). Impact of amino acid substitutions in the hepatitis C virus genotype 1b core region on liver steatosis and hepatic oxidative stress in patients with chronic hepatitis C. *Liver Int* 30, 554–559.

Tai, A.W., and Salloum, S. (2011). The Role of the Phosphatidylinositol 4-Kinase PI4KA in Hepatitis C Virus-Induced Host Membrane Rearrangement. *PLoS ONE* 6, e26300.

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.

Tanji, Y., Kaneko, T., Satoh, S., and Shimotohno, K. (1995). Phosphorylation of hepatitis C virus-encoded nonstructural protein NS5A. *J Virol* 69, 3980–3986.

Targett-Adams, P., Hope, G., Boulant, S., and McLauchlan, J. (2008). Maturation of hepatitis C virus core protein by signal peptide peptidase is required for virus production. *J Biol Chem* 283, 16850–16859.

Taylor, D.R., Shi, S.T., Romano, P.R., Barber, G.N., and Lai, M.M. (1999). Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science* 285, 107–110.

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.

Thein, H.-H., Yi, Q., Dore, G.J., and Krahn, M.D. (2008). Estimation of stage-specific fibrosis progression rates in chronic hepatitis C virus infection: a meta-analysis and meta-regression. *Hepatology* 48, 418–431.

Thimme, R., Bukh, J., Spangenberg, H.C., Wieland, S., Pemberton, J., Steiger, C., Govindarajan, S., Purcell, R.H., and Chisari, F.V. (2002). Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 15661–15668.

Thimme, R., Oldach, D., Chang, K.M., Steiger, C., Ray, S.C., and Chisari, F.V. (2001). Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *J Exp Med* 194, 1395–1406.

Thomas, D.L., Thio, C.L., Martin, M.P., Qi, Y., Ge, D., O'Huigin, C., Kidd, J., Kidd, K., Khakoo, S.I., Alexander, G., et al. (2009). Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature* 461, 798–801.

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

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

Thomssen, R., Bonk, S., and Thiele, A. (1993). Density heterogeneities of hepatitis C virus in human sera due to the binding of beta-lipoproteins and immunoglobulins. *Med Microbiol Immunol* 182, 329–334.

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.

Tomkin, G.H., and Owens, D. (2001). Abnormalities in apo B-containing lipoproteins in diabetes and atherosclerosis. *Diabetes Metab Res Rev* 17, 27–43.

Toroney, R., Nallagatla, S.R., Boyer, J.A., Cameron, C.E., and Bevilacqua, P.C. (2010). Regulation of PKR by HCV IRES RNA: importance of domain II and NS5A. *J Mol Biol* 400, 393–412.

Torresi, J., Johnson, D., and Wedemeyer, H. (2011). Progress in the development of preventive and therapeutic vaccines for hepatitis C virus. *J Hepatol* 54, 1273–1285.

Triyatni, M., Berger, E.A., and Saunier, B. (2011). A New Model to Produce Infectious Hepatitis C Virus without the Replication Requirement. *PLoS Pathog* 7, e1001333.

Tsai, J., Qiu, W., Kohen-Avramoglu, R., and Adeli, K. (2007). MEK-ERK inhibition corrects the defect in VLDL assembly in HepG2 cells: potential role of ERK in VLDL-ApoB100 particle assembly. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27, 211–218.

Tsutsumi, T., Matsuda, M., Aizaki, H., Moriya, K., Miyoshi, H., Fujie, H., Shintani, Y., Yotsuyanagi, H., Miyamura, T., Suzuki, T., et al. (2009). Proteomics analysis of mitochondrial proteins reveals overexpression of a mitochondrial protein chaperon, prohibitin, in cells expressing hepatitis C virus core protein. *Hepatology* 50, 378–386.

Tsutsumi, T., Suzuki, T., Shimoike, T., Suzuki, R., Moriya, K., Shintani, Y., Fujie, H., Matsuura, Y., Koike, K., and Miyamura, T. (2002). Interaction of hepatitis C virus core protein with retinoid X receptor alpha modulates its transcriptional activity. *Hepatology* 35, 937–946.

## V

Vassilaki, N., and Mavromara, P. (2009). The HCV ARFP/F/core+1 protein: production and functional analysis of an unconventional viral product. *IUBMB Life* 61, 739–752.

Vendemiale, G., Grattagliano, I., Portincasa, P., Serviddio, G., Palasciamo, G., and Altomare, E. (2001). Oxidative stress in symptom-free HCV carriers: relation with ALT flare-up. *Eur J Clin Invest* 31, 54–63.

Vescovo, T., Romagnoli, A., Perdomo, A.B., Corazzari, M., Ciccocanti, F., Alonzi, T., Nardacci, R., Ippolito, G., Tripodi, M., Garcia-Monzon, C., et al. (2012). Autophagy protects cells from HCV-induced defects in lipid metabolism. *Gastroenterology* 142, 644–653.e3.

Vieyres, G., Thomas, X., Descamps, V., Duverlie, G., Patel, A.H., and Dubuisson, J. (2010). Characterization of the envelope glycoproteins associated with infectious hepatitis C virus. *J Virol* 84, 10159–10168.

## W

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

Wang, A.-G., Lee, D.-S., Moon, H.-B., Kim, J.-M., Cho, K.-H., Choi, S.-H., Ha, H.-L., Han, Y.-H., Kim, D.-G., Hwang, S.B., et al. (2009). Non-structural 5A protein of hepatitis C virus induces a range of liver pathology in transgenic mice. *J Pathol* 219, 253–262.

Wang, H., Gilham, D., and Lehner, R. (2007). Proteomic and lipid characterization of apolipoprotein B-free luminal lipid droplets from mouse liver microsomes: implications for very low density lipoprotein assembly. *J Biol Chem* 282, 33218–33226.

Wang, H., Wei, E., Quiroga, A.D., Sun, X., Touret, N., and Lehner, R. (2010a). Altered lipid droplet dynamics in hepatocytes lacking triacylglycerol hydrolase expression. *Mol Biol Cell* 21, 1991–2000.

Wang, L., and Boyer, J.L. (2004). The maintenance and generation of membrane polarity in hepatocytes. *Hepatology* 39, 892–899.

Wang, T., Campbell, R.V., Yi, M.K., Lemon, S.M., and Weinman, S.A. (2010b). Role of Hepatitis C virus core protein in viral-induced mitochondrial dysfunction. *J Viral Hepat* 17, 784–793.

Wang, T., and Weinman, S.A. (2006). Causes and consequences of mitochondrial reactive oxygen species generation in hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol* 21 Suppl 3, S34–37.

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.

Watashi, K., Ishii, N., Hijikata, M., Inoue, D., Murata, T., Miyanari, Y., and Shimotohno, K. (2005). Cyclophilin B is a functional regulator of hepatitis C virus RNA polymerase. *Mol Cell* 19, 111–122.

Webster, D.P., Klenerman, P., Collier, J., and Jeffery, K.J.M. (2009). Development of novel treatments for hepatitis C. *Lancet Infect Dis* 9, 108–117.

Weinlich, S., Hüttelmaier, S., Schierhorn, A., Behrens, S.-E., Ostareck-Lederer, A., and Ostareck, D.H. (2009). IGF2BP1 enhances HCV IRES-mediated translation initiation via the 3'UTR. *RNA* 15, 1528–1542.

Welbourn, S., and Pause, A. (2007). The hepatitis C virus NS2/3 protease. *Curr Issues Mol Biol* 9, 63–69.

Welsch, S., Miller, S., Romero-Brey, I., Merz, A., Bleck, C.K.E., Walther, P., Fuller, S.D., Antony, C., Krijnse-Locker, J., and Bartenschlager, R. (2009). Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. *Cell Host Microbe* 5, 365–375.

Whittaker, S., Marais, R., and Zhu, A.X. (2010). The role of signaling pathways in the development and treatment of hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 29, 4989–5005.

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

Wölk, B., Sansonno, D., Kräusslich, H.G., Dammacco, F., Rice, C.M., Blum, H.E., and Moradpour, D. (2000). Subcellular localization, stability, and trans-cleavage competence of the hepatitis C virus NS3-NS4A complex expressed in tetracycline-regulated cell lines. *J Virol* 74, 2293–2304.

Woodhouse, S.D., Narayan, R., Latham, S., Lee, S., Antrobus, R., Gangadharan, B., Luo, S., Schroth, G.P., Klenerman, P., and Zitzmann, N. (2010). Transcriptome sequencing, microarray, and proteomic analyses reveal cellular and metabolic impact of hepatitis C virus infection in vitro. *Hepatology* 52, 443–453.

Wozniak, A.L., Griffin, S., Rowlands, D., Harris, M., Yi, M., Lemon, S.M., and Weinman, S.A. (2010). Intracellular proton conductance of the hepatitis C virus p7 protein and its contribution to infectious virus production. *PLoS Pathog* 6, e1001087.

## Y

Yamaguchi, A., Tazuma, S., Nishioka, T., Ohishi, W., Hyogo, H., Nomura, S., and Chayama, K. (2005). Hepatitis C virus core protein modulates fatty acid metabolism and thereby causes lipid accumulation in the liver. *Dig Dis Sci* 50, 1361–1371.

Yanagi, M., St Claire, M., Emerson, S.U., Purcell, R.H., and Bukh, J. (1999). In vivo analysis of the 3' untranslated region of the hepatitis C virus after in vitro mutagenesis of an infectious cDNA clone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 2291–2295.

Yano, M., Ikeda, M., Abe, K., Kawai, Y., Kuroki, M., Mori, K., Dansako, H., Ariumi, Y., Ohkoshi, S., Aoyagi, Y., et al. (2009). Oxidative stress induces anti-hepatitis C virus status via the activation of extracellular signal-regulated kinase. *Hepatology* 50, 678–688.

Ye, J. (2007). Reliance of host cholesterol metabolic pathways for the life cycle of hepatitis C virus. *PLoS Pathog* 3, e108.

Yen, C.-L.E., Stone, S.J., Koliwad, S., Harris, C., and Farese, R.V., Jr (2008). Thematic review series: glycerolipids. DGAT enzymes and triacylglycerol biosynthesis. *J Lipid Res* 49, 2283–2301.

Yi, M., and Lemon, S.M. (2003). 3' nontranslated RNA signals required for replication of hepatitis C virus RNA. *J Virol* 77, 3557–3568.

Yi, M., Ma, Y., Yates, J., and Lemon, S.M. (2009). Trans-complementation of an NS2 defect in a late step in hepatitis C virus (HCV) particle assembly and maturation. *PLoS Pathog* 5, e1000403.

Yoon, J.C., Lim, J.-B., Park, J.H., and Lee, J.M. (2011). Cell-to-cell contact with hepatitis C virus-infected cells reduces functional capacity of natural killer cells. *J Virol* 85, 12557–12569.

Yoshida, T., Takayama, K., Kondoh, M., Sakurai, F., Tani, H., Sakamoto, N., Matsuura, Y., Mizuguchi, H., and Yagi, K. (2011). Use of human hepatocyte-like cells derived from induced pluripotent stem cells as a model for hepatocytes in hepatitis C virus infection. *Biochem Biophys Res Commun* 416, 119–124.

You, S., Stump, D.D., Branch, A.D., and Rice, C.M. (2004). A cis-acting replication element in the sequence encoding the NS5B RNA-dependent RNA polymerase is required for hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* 78, 1352–1366.

## Z

Zachary, I. (2003). VEGF signalling: integration and multi-tasking in endothelial cell biology. *Biochem Soc Trans* 31, 1171–1177.

Zarski, J.P., and Leroy, V. (1999). Counselling patients with hepatitis C. *J Hepatol* 31 Suppl 1, 136–140.

Zegers, M.M., and Hoekstra, D. (1998). Mechanisms and functional features of polarized membrane traffic in epithelial and hepatic cells. *Biochem. J.* 336 ( Pt 2), 257–269.

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., Turek, M., and Baumert, T.F. (2010). Getting closer to the patient: upgrade of hepatitis C virus infection in primary human hepatocytes. *J Hepatol* 53, 388–389.

Zhang, T., Li, Y., Lai, J.-P., Douglas, S.D., Metzger, D.S., O'Brien, C.P., and Ho, W.-Z. (2003). Alcohol potentiates hepatitis C virus replicon expression. *Hepatology* 38, 57–65.

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.

### **Sans auteur**

(1999). Global surveillance and control of hepatitis C. Report of a WHO Consultation organized in collaboration with the Viral Hepatitis Prevention Board, Antwerp, Belgium. *J Viral Hepat* 6, 35–47.

